

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Procesos moleculares implicados en la proliferación de
astrocitos de rata en cultivo.**

**Efectos de la glucosa, del péptido semejante al Glucagón-2 y
de la insulina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yannick Le Baut Ayuso

Directores

Juan Miguel Ruiz Albusac

Esther Velázquez Sánchez

Enrique Bláz

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PROCESOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA
PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS DE RATA EN
CULTIVO. EFECTOS DE LA GLUCOSA, DEL
PÉPTIDO SEMEJANTE AL GLUCAGÓN-2 Y DE LA
INSULINA.**

TESIS DOCTORAL

YANNICK LE BAUT AYUSO

MADRID, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PROCESOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA
PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS DE RATA EN CULTIVO.
EFECTOS DE LA GLUCOSA, DEL PÉPTIDO SEMEJANTE AL
GLUCAGÓN-2 Y DE LA INSULINA**

MEMORIA PRESENTADA POR

YANNICK LE BAUT AYUSO

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JUAN MIGUEL RUIZ ALBUSAC
DRA. ESTHER VELÁZQUEZ SANCHEZ
DR. ENRIQUE BLÁZQUEZ FERNANDEZ

MADRID, 2018



Don **Juan Miguel Ruiz**, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense el Madrid,

Dña. **Esther Velázquez Sánchez**, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense el Madrid,

Don **Enrique Blázquez Fernández**, profesor honorífico del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense el Madrid,

CERTIFICAN:

Que el graduado Don **Yannick Le Baut Ayuso** ha alcanzado la formación y los conocimientos suficientes durante el periodo de doctorado para la realización del trabajo titulado: **“PROCESOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS DE RATA EN CULTIVO. EFECTOS DE LA GLUCOSA, DEL PÉPTIDO SEMEJANTE AL GLUCAGÓN-2 Y DE LA INSULINA”**, bajo nuestra dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense el Madrid para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expiden el presente certificado en Madrid, a de junio de 2018.

VºBº de los directores


Fdo.: Dr. Juan Miguel Ruiz Albusac


Fdo.: Dra. Esther Velázquez Sánchez


Fdo.: Dr. Enrique Blázquez Fernández

*Nos esse quasi nanos, gigantium
humeris insidentes, ut possimus
plura eis et remotiora videre, non
utique proprii visus acumine, aut
eminentia corporis, sed quia in altum
subvenimur et extollimur
magnitudine gigantea.*

Bernardus Carnotensis

***Somos como enanos a hombros de
gigantes. Podemos ver más y más
lejos que ellos, no por la agudeza de
nuestra vista ni por la altura de
nuestro cuerpo, sino porque somos
levantados por su gran altura.***

Bernard de Chartres

En una lectura de tesis, una única persona opta al grado de doctor, pero no cabe la menor duda de que una tesis no es obra de una única persona y como “es de bien nacido ser agradecido” quisiera agradecer:

- *Al Dr. Enrique Blázquez, el haberme permitido formar parte de su grupo de investigación.*
- *A Juan Miguel, el cariño mostrado desde que me impartió la asignatura de Bioquímica en la carrera y en particular durante los años pasados en su laboratorio.*
- *A Esther y de nuevo a Juan Miguel, el haberme apoyado desde el principio del máster, ¡pese a tener una formación con **nula** vertiente básica!, pero sobre todo haber tenido la paciencia de explicar y enseñarme las técnicas utilizadas en su laboratorio.*
- *A los Dres. Francisco Carricondo y Bárbara Romero y a Encarna, habernos proporcionado los animales necesarios para llevar a cabo la experimentación.*
- *A la Dra. Julie Chowen, por aceptarme en su laboratorio para realizar la estancia y darme la oportunidad de ver como se trabaja en otros laboratorios.*
- *Al departamento, por permitirme dar clases prácticas en calidad de “Colaborador Honorífico” ya que permite descubrir la propia capacidad de transmitir humildemente lo que se puede, y en su caso, conseguir que algún alumno sea picado por “el gusanillo” de la investigación.*
- *A mis compañeros de comidas: Ángel, Pilar, Ana, Nuria, Vero y Carmen, a los que no puedo olvidar, ya que “no solo de ciencia vive el hombre” y estos años no hubiesen sido lo mismo sin tanto humor, juegos de palabras y conversaciones absurdas.*
- *Y a todas las personas que me han acompañado en estos años.*

- *Pero sobre todo a mi familia, el apoyo prestado durante todos estos años en casa ya que “con mi mentalidad cuadriculada y hablando de cosas raras” ha tenido que ser complicado. La verdad es que sin ellos no hubiese sido posible comenzar este viaje que dentro de poco verá su fin.*

Esto no son más que agradecimientos, pero hay alguien a quien debo dedicarle esta tesis, a Miguel Ayuso Montero, mi yayo, y es que ya incluso antes de empezar la carrera ya me llamaba doctor.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN/SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	17
EL GEN DEL PROGLUCAGÓN: LOCALIZACIÓN, ESTRUCTURA Y PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL	19
1.1. Regulación de la expresión del gen del proglucagón y de la secreción de GLP-2	20
1.2. Estructura y metabolismo del GLP-2. Análogos del GLP-2	22
2. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL GLP-2	24
2.1. Intestinales	24
2.2. Extraintestinales	27
2.3. El receptor de GLP-2 (GLP-2R)	29
2.3.1. Estructura y localización subcelular del GLP-2R	29
2.3.2. Sistemas de transducción de señales acoplados al GLP-2R	30
2.3.3. Mediadores extracelulares implicados en las respuestas biológicas al GLP-2	32
3. EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADO POR EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc)	34
3.1. Guanilato ciclasa: Tipos, localización. Composición, estructura y mecanismos de acción	35
3.2. Localización subcelular de las subunidades alfa 1, beta 1 y alfa 2 de la GCs. Efectos independientes del GMPc.	37
4. INSULINA: ESTRUCTURA, MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS	40
4.1. Origen de la insulina cerebral	41
4.2. Mecanismo de acción. Receptores de insulina	42
4.3. Efecto de la insulina en el cerebro	43
5. PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN EL CEREBRO/SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	44
5.1. Papel de la glucosa en las células nerviosas	45
5.2. Expresión del receptor de GLP-2 en astrocitos de rata en cultivo	47
5.3. Efectos biológicos del GLP-2 sobre los astrocitos de rata en cultivo	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. MATERIALES	55
2. ANIMALES	56
2.1. Preparación de los cultivos de astrocitos de rata y tratamientos	57
3. TÉCNICAS	60
3.1. Inmunocitoquímica	60

3.2. Tinción con cristal violeta	61
3.3. Incorporación de [³ H]-timidina al ADN	62
3.4. Medida del AMPc intracelular	62
3.5. Preparación de ácidos ribonucleicos (ARN) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) del receptor de GLP-2 (GLP-2R) y de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ de la guanilato ciclasa soluble	63
3.6. Identificación de proteínas por inmunotransferencia “Western blotting”	65
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
RESULTADOS	71
1. EFECTO DE LA GLUCOSA Y DEL GLP-2 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LOS ASTROCITOS. ESPECIFICIDAD DE LAS ACCIONES BIOLÓGICAS DEL GLP-2	73
2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-2	76
3. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN	83
4. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE GLÚCIDOS Y LÍPIDOS	90
5. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES	103
6. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2, LA INSULINA, EL EGF Y LA FORSCOLINA (EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE GLP-2), SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA (A NIVEL DE PROTEÍNA Y ARNm) DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 1$, $\beta 1$ Y $\alpha 2$ DE LA GUANILATO CICLASA SOLUBLE	125
DISCUSIÓN	137
1. LA GLUCOSA INDUCE LA PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS	139
2. EL GLP-2 INCREMENTA LA PROLIFERACIÓN DE LOS ASTROCITOS A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA	140
3. EL GLP-2 EJERCE SUS ACCIONES BIOLÓGICAS A TRAVÉS DE SU PROPIO RECEPTOR	141
4. LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL GLP-2R EN LOS ASTROCITOS PUEDE SER REGULADA POR GLUCOSA Y OTROS FACTORES	141
5. LA GLUCOSA MODIFICA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA PROLIFERACIÓN, LA SUPERVIVENCIA Y LA DIFERENCIACIÓN CELULARES. EFECTOS DE LA INSULINA Y DEL GLP-2 ..	144
6. PAPEL DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, COACTIVADORES Y SENSORES METABÓLICOS	145
7. PAPEL DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ACETIL- COENZIMA A	150
8. PAPEL DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES Y ENZIMAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA	151
9. LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA ACTÚAN A TRAVÉS DE DIVERSAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES	156

9.1.	Efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de IR, IGF-1R e IRS-1. ..	157
9.2.	Efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de proteínas implicadas en la señalización PI3K/Akt	160
9.3.	Efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de proteínas situadas corriente debajo de la activación de PI3K/Ras.....	164
10.	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 1$, $\beta 1$ Y $\alpha 2$ DE LA GUANILATO CICLASA SOLUBLE	166
10.1.	La glucosa, el GLP-2 y la insulina (en ausencia y presencia de GLP-2) modifican la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclasa soluble en los astrocitos de rata en cultivo	167
10.2.	El GLP-2 y la insulina (en ausencia y presencia de GLP-2) modifican la expresión génica de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclasa soluble en los astrocitos de rata en cultivo.....	169
10.3.	El EGF (en ausencia y presencia de GLP-2) modifica la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclasa soluble en los astrocitos de rata en cultivo	171
10.4.	La forskolina (en ausencia y presencia de GLP-2) modifica la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclasa soluble en los astrocitos de rata en cultivo ..	172
CONCLUSIONES		175
BIBLIOGRAFÍA		179
ANEXO		201

ABREVIATURAS

Akt: Proteína quinasa B

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

AP-1: Proteína activadora 1

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato o trifosfato de adenosina

Bad: Proteína proapoptótica perteneciente a la subfamilia BH3 (promotor de muerte asociado a Bcl-2)

Bcl-2: familia de proteínas reguladoras de la muerte celular. Su nombre deriva del linfoma de células B2

CCK: Colecistoquinina

cIAP: inhibidor de apoptosis celular

CREB: Proteína de unión a los elementos de respuesta a AMP cíclico

DPP-IV/CD26: Dipeptidil-peptidasa IV

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ErbB: Familia de proteínas receptores con actividad tirosina-quinasa estructuralmente relacionados con el receptor de EGF

ERK 1/2: Quinasas tipos 1/2 reguladas por señales extracelulares

GCG: Gen del preproglucagón

GH: Hormona de crecimiento

GIP: Polipéptido inhibidor gástrico, polipéptido insulínico dependiente de glucosa

GK: Glucoquinasa

GLPs: Péptidos semejantes al glucagón

GLP-1: Péptido semejante al glucagón 1

GLP-2: Péptido semejante al glucagón 2

GLP-2 (1-33): GLP-2 intacto, biológicamente activo

GLP-2 (3-33): GLP-2 truncado, biológicamente inactivo

[Gly²]GLP-2: Análogo de GLP-2 resistente a la acción de DPP-IV

GLP-2R: Receptor de GLP-2

GLPRs: Receptores de péptidos semejantes al glucagón

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

GRPP: Péptido pancreático relacionado con la glicentina

GSK-3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3 β

G α i/o: Subunidad de las proteínas G que inhibe la adenilato ciclasa

G α s: Subunidad de las proteínas G que activa la adenilato ciclasa

HeLa: Línea celular procedente de un tumor humano

IFN- γ : Interferón gamma

IGFs: Factores de crecimiento semejantes a la insulina

IGF-1: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1

IGF-2: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 2

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo-1

KFG: Factor de crecimiento de los queratinocitos

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MPGF: Fragmento mayor del proglucagón

mTOR: Diana de la rapamicina de mamíferos

NO: Óxido nítrico

PC: Proconvertasas de hormonas

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PKA: Proteína quinasa AMP cíclico dependiente

POMC: Proopiomelanocortina

Ras: Proteínas G monoméricas con actividad GTP hidrolasa (GTPasa)

RMID: Resección mayor del intestino delgado

SEMFS: Miofibroblastos subepiteliales

SGLT: Cotransportadores de sodio-glucosa

SIC: Síndrome del intestino corto

SNC: Sistema nervioso central

s-CTX: Telopéptido C-terminal procedente de la degradación del colágeno tipo-1

TNF- α : Factor de necrosis tumoral tipo α

TLRs: receptores semejantes a Toll

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

Wnt: Proteínas señalizadoras

XIAP: Inhibidor ligado a X de la proteína de la apoptosis

RESUMEN/SUMMARY

Introducción: El GLP-2 es un péptido derivado del diferente procesamiento postraducciona del proglucagón que tiene lugar en intestino y cerebro, en donde ejerce sus efectos biológicos. En el intestino actúa como un factor trófico. En el hipotálamo parece mostrar un efecto anorexigénico y en los astrocitos en cultivo favorece la proliferación.

La insulina se sintetiza en las células β -pancreáticas y posiblemente también en sistema nervioso central. Es la hormona anabólica por excelencia en los tejidos periféricos, siendo mucho menos conocida sus funciones en el cerebro. Tanto la insulina como el GLP-2 actúan a través de sus receptores presentes en ciertas regiones del cerebro.

Hoy se asume que los astrocitos desempeñan un papel fundamental en las distintas funciones del sistema nervioso central, incluyendo la captura y metabolismo de la glucosa en el cerebro.

La **hipótesis** de este trabajo es que la glucosa actúa como un regulador fundamental de la proliferación de los astrocitos y por tanto influir en alguna de las diversas vías de señalización implicadas en este proceso.

Puesto que las acciones de la insulina a nivel central son menos conocidas que en los tejidos periféricos, el **objetivo principal** de este trabajo fue estudiar la interdependencia de la glucosa, el GLP-2 y la insulina en la proliferación de estas células y las posibles vías de señalización implicadas.

Objetivos específicos:

- Efecto de la glucosa y del GLP-2 sobre la proliferación de los astrocitos. Regulación de la expresión del receptor de GLP-2.
- Efecto de la glucosa, el GLP-2 y la insulina sobre:
 - ❖ La expresión de marcadores de proliferación y diferenciación y de proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares.
 - ❖ La expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de glúcidos y lípidos.

- ❖ La expresión de las subunidades de la guanilato ciclasa soluble.

Material y métodos: Se utilizaron cultivos de astrocitos procedentes de corteza cerebral de neonatos de rata, caracterizados mediante técnicas de inmunocitoquímica. Las células fueron estimuladas durante diferentes tiempos con GLP-2, insulina y otros factores en presencia de medios conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Dependiendo del experimento concreto se realizaron pruebas de incorporación de [³H]timidina, tinción con cristal violeta y valoración del AMPc intracelular. Además, se utilizaron técnicas de inmunotransferencia y de PCR a tiempo real para conocer la expresión de diversos genes a nivel de proteína y de ARN mensajero.

Resultados y discusión: Nuestros resultados mostraron que la glucosa induce la proliferación de los astrocitos de rata en cultivo y que esta fue potenciada por la acción del GLP-2 (a través de su propio receptor) a elevadas concentraciones de glucosa. Además, la expresión del GLP-2R fue regulada por la glucosa entre otros factores.

También se estudió la expresión de proteínas implicadas en la proliferación y diferenciación celulares (pKi 67, c-Fos y GFAP). En nuestras condiciones, los niveles de expresión fueron dependientes de la concentración de glucosa y/o del tiempo de incubación.

También se estudiaron los efectos sobre la expresión de factores de transcripción, coactivadores y sensores metabólicos. Así se observó que, la expresión de SREBP-1c, PGC-1 α y AMPK fueron dependientes de glucosa.

En este trabajo se muestra que el sistema GLUT2/GK (descrito en hipotálamo) se expresa también en la corteza cerebral y es regulado por GLP-2, insulina y glucosa.

El siguiente objetivo fue estudiar si la expresión/activación de varios mediadores involucrados en la señal de transducción de la insulina podían alterarse por la glucosa o el GLP-2. Puesto que el GLP-2 bloqueó la activación del IRS-1 (inhibición de la fosforilación en tirosina), un mediador de la señal de la insulina, indica claramente que éste péptido no

inicia su señal a través de este mediador, aunque ambas vías puedan converger posteriormente a nivel de la PI3K o de las ERK1/2.

Por último, se estudió la influencia de la glucosa, el GLP-2 y la insulina sobre la expresión y la localización de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ de la GCs. Nuestros resultados indican un aumento dosis-dependiente de la concentración de glucosa de la expresión de las tres subunidades. En general, la insulina estimuló la expresión de los ARNm de las tres subunidades, mientras que el GLP-2 tuvo un efecto inhibitor. Asimismo, ambos péptidos regularon la localización celular de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$. La presencia del GLP-2 bloqueó el potente efecto producido por la insulina sobre la expresión de los ARNm de las tres subunidades y de la proteína total de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$. Además, el GLP-2 disminuyó la cantidad de proteína presente en el citosol, inducida por la insulina a las 24 horas.

Conclusiones:

- El efecto mitogénico realizado por GLP-2 sobre los astrocitos tiene lugar a través de su propio receptor y es dependiente de la concentración de glucosa.
- La glucosa promueve la proliferación de los astrocitos y regula la expresión del GLP-2R.
- La glucosa regula la expresión de sensores metabólicos (AMPK), de factores (SREBP-1c) y coactivadores (PCG1 α) de la transcripción.
- Los astrocitos de la corteza cerebral de rata expresan el sistema sensor de glucosa GLUT-2/GK y en su regulación intervienen la glucosa, el GLP-2 y la insulina.
- La glucosa regula la expresión/actividad de varias proteínas implicadas en la transducción de señales generadas por insulina y otros ligandos (IRS-1, PI3K, Akt, GSK3, mTOR, p70s6K, ERK1/2), así como la expresión de las proteínas que conforman la GCs.

- En términos generales, la expresión/activación de las proteínas que intervienen en las señales iniciadas por el GLP-2 y por la insulina en los astrocitos son dependientes de la concentración de glucosa.
- Los efectos biológicos del GLP-2 no están mediados por la activación del IRS-1, aunque comparten algunos componentes de la señal de la insulina.
- La insulina y el GLP-2 regulan la expresión de las subunidades componentes de la GCs siendo más marcado el efecto producido por la insulina. Ambos péptidos regulan además su localización celular. La presencia del GLP-2 bloqueó el potente efecto producido por la insulina sobre los componentes de la GCs.

Introduction: GLP-2 is a peptide derived from the different post-translational processing of proglucagon that takes place in intestine and brain where it exerts its biological effects. In the gut, GLP-2 acts as a trophic factor. In the hypothalamus it seems to show an anorexigenic effect and in cultured astrocytes it stimulates the proliferation.

Insulin is synthesized in pancreatic β -cells and possibly also in the central nervous system. It is the anabolic hormone by excellence in the peripheral tissues, being much less known its functions in the brain. Both insulin and GLP-2 act through their own receptors which are present in certain regions of the brain.

Nowadays, it is assumed that astrocytes play a fundamental role in the distinct functions of the central nervous system, including the capture and metabolism of glucose in brain.

The **hypothesis** of this work is that glucose acts as an essential regulator of the proliferation of astrocytes and therefore can modulate one of the various signaling pathways involved in this process.

Since the actions of insulin at the central level are less known than in peripheral tissues, the **main objective** of this work was to study the interdependence of glucose, GLP-2 and insulin on astrocyte proliferation and the pathways of signaling involved.

Specific objectives:

- The effect of glucose and GLP-2 on the proliferation of astrocytes. Regulation of GLP-2 receptor expression.
- The effect of glucose, GLP-2 and insulin on:
 - ❖ The expression of proliferation and differentiation markers and proteins involved in intracellular signal transduction.
 - ❖ The expression of proteins involved in sugars and lipids metabolism.
 - ❖ The expression of the soluble guanylate cyclase subunits.

Material and methods: Astrocyte cultures from the cerebral cortex of newborn rat were used, and characterized by immunocytochemistry techniques. These cells were stimulated during different times with GLP-2, insulin and other factors in the presence of different media containing concentrations of glucose. Depending on the specific experiment, [³H]thymidine incorporation tests, crystal violet staining and intracellular cAMP measurements were performed. In addition, western blotting and real-time PCR techniques were used to determine the expression of various genes at the protein and messenger RNA levels.

Results and discussion: Our results showed that glucose induces the proliferation of cultured rat astrocytes and that this proliferation was enhanced by the action of GLP-2 (through its own receptor) at high glucose concentrations. In addition, the expression of GLP-2R was regulated by glucose among other factors.

We also studied the expression of proteins involved in cell proliferation and differentiation (pKi 67, c-Fos and GFAP). Under our conditions, the expression levels were dependent on the glucose concentration and/or the incubation time.

The effects on the expression of transcription factors, coactivators and metabolic sensors were also studied. Thus it was observed that, the expression of SREBP-1c, PGC-1 α and AMPK were glucose dependent.

In this work, it is shown that the GLUT2/GK system (described in the hypothalamus) is also expressed in the cerebral cortex and is also regulated by GLP-2, insulin and glucose.

The next objective was to study whether the expression/activation of several mediators involved in the insulin signal transduction could be altered by glucose or GLP-2. Since GLP-2 blocked the activation of IRS-1 (inhibition of the tyrosine phosphorylation), a mediator of the insulin signal, it clearly indicates that this peptide does not initiate its signal

through this mediator, although both pathways may converge subsequently at the level of the PI3K or the ERK1/2.

Finally, the influence of glucose, GLP-2 and insulin on the expression and localization of subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\beta 1$ of GCs was studied. Our results indicate a dose-dependent increase of the expression of the three subunits respect to glucose concentration. In general, insulin stimulated the expression of the mRNAs of the three subunits, while GLP-2 had an inhibitory effect. Also, both peptides regulated the cellular localization of the $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits. The presence of GLP-2 blocked the potent effect produced by insulin on the expression of the mRNAs of the three subunits and the total protein of the $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits. In addition, GLP-2 decreased the amount of protein present in the cytosol, induced by insulin at 24 hours.

Conclusions:

- The mitogenic effect induced by GLP-2 on astrocytes takes place through its own receptor and is dependent on the glucose concentration.
- Glucose promotes the proliferation of astrocytes and regulates the expression of GLP-2R.
- Glucose regulates the expression of metabolic sensors (AMPK), factors (SREBP-1c) and coactivators (PCG1 α) of the transcription.
- Rat cerebral cortex astrocytes express the GLUT-2/GK glucose sensor system and glucose, GLP-2 and insulin are involved in its regulation.
- Glucose regulates the expression/activity of several proteins involved in the transduction of signals generated by insulin and other ligands (IRS-1, PI3K, Akt, GSK3, mTOR, p70s6K, ERK1/2), as well as the expression of the GCs subunits.

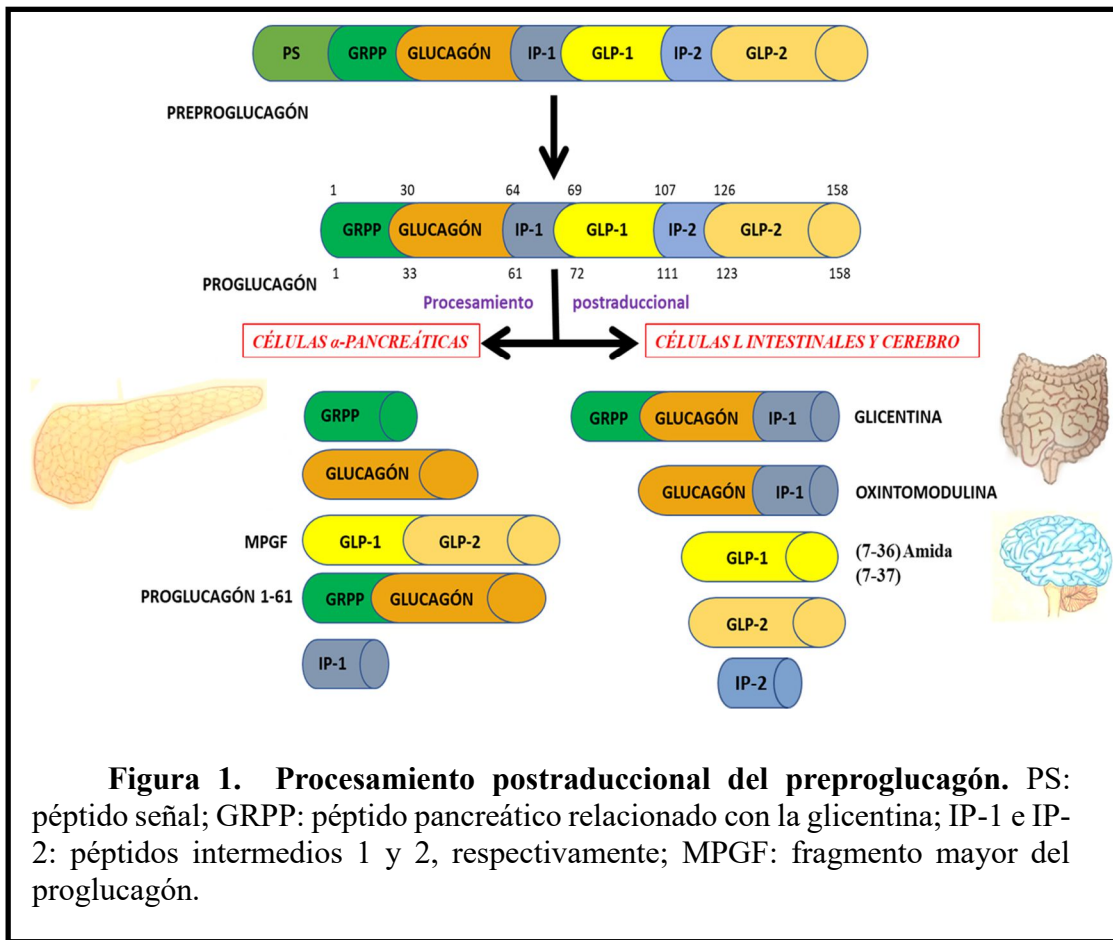
- In general, the expression/activation of the proteins involved in GLP-2R and IR signal transduction pathways in astrocytes are dependent on the glucose concentration.
- The biological effects of GLP-2 are not mediated by the activation of IRS-1, although they share some components of the insulin signal.
- Insulin and GLP-2 regulate the expression of the GCs subunits, being the effect produced by insulin more marked. Both peptides also regulate their cellular localization. The presence of GLP-2 blocked the potent effect produced by insulin on the components of the GCs.

INTRODUCCIÓN

EL GEN DEL PROGLUCAGÓN: LOCALIZACIÓN, ESTRUCTURA Y PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL

En humanos, el gen del proglucagón se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 (2q36-q37). Consta de seis exones que codifican distintos dominios peptídicos; los exones 3, 4 y 5 codifican para el glucagón, el GLP-1 y el GLP-2 (péptidos semejantes al glucagón), respectivamente. A diferencia de lo que ha sido descrito en reptiles, peces y aves, en mamíferos, la estructura del ARNm transcrito es idéntica en el páncreas (células alfa de los islotes de Langerhans), en los intestinos delgado y grueso (células L entero-endocrinas presentes en el yeyuno distal, el íleon y el colon), y en el cerebro (neuronas del tronco cerebral caudal e hipotálamo)^{1,2,3}.

La traducción del único ARNm da lugar al preproglucagón, una cadena de 180 aminoácidos, que contiene, además de las secuencias del glucagón y de los péptidos relacionados con el glucagón, las de la glicentina y la oxintomodulina. Una vez eliminado el péptido señal, la producción y secreción de las diversas hormonas es tejido-específica, debido al procesamiento postraducciona l alternativo del gen del proglucagón. Así, como se muestra en la **figura 1**, en las células alfa pancreáticas, la acción de la prohormona convertasa-2 (PC-2) da lugar al glucagón, al péptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP), al péptido intermedio-1 (IP-1), y al fragmento mayor del proglucagón (MPGF) que contiene las secuencias del GLP-1 y del GLP-2. Salvo el glucagón, que también es liberado por las células A del estómago^{4,5}, y que juega un papel bien definido en la homeostasis de la glucosa en suero, los otros péptidos no tienen función fisiológica reconocida. Por otra parte, la acción de las PC-1 y 3 sobre el proglucagón en las células L intestinales origina GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, IP-2 y glicentina. Asimismo, mediante un procesado del proglucagón similar al de las células L intestinales, el GLP-2 también es sintetizado en el tronco del cerebro⁶; desde allí se transportará a regiones distales del sistema nervioso central (SNC), donde ejercerá sus acciones específicas⁷.



1.1. Regulación de la expresión del gen del proglucagón y de la secreción de GLP-2

Se han descrito varios factores de transcripción implicados en el reconocimiento de la secuencia promotora del gen del proglucagón en las células α de los islotes pancreáticos y en las células L enteroendocrinas⁸. Uno de ellos, el ISL1, se expresa en todas las células de los islotes pancreáticos y también regula la transcripción de los genes que codifican para la insulina y la somatoestatina. El control de la actividad de este gen se realiza a través de diversas vías de señalización, iniciadas por el péptido liberador de gastrina, insulina/IGF-1 o Wnt⁸. Sin embargo, el mecanismo molecular de la expresión del gen del proglucagón en el cerebro es poco conocido².

La expresión intestinal del gen del proglucagón, y por tanto de la síntesis y la secreción de GLP-2, es inducida por nutrientes, especialmente carbohidratos y lípidos, entre los que hay que destacar los ácidos grasos volátiles de cadena corta, productos del metabolismo microbiano^{9,10}, pero también de algunos aminoácidos. Aunque una producción basal de proglucagón se produce incluso en situaciones de ayuno⁷, los niveles plasmáticos de GLP-2 se elevan rápidamente después de la re-alimentación¹¹. Se considera que la secreción y los niveles plasmáticos de GLP-2 tienen un claro comportamiento bifásico, regulado por la dieta. Un primer pico aparece rápidamente (entre 15 y 30 minutos después del consumo de alimentos) en respuesta a la participación de circuitos neuronales y endocrinos en el duodeno. El segundo pico, que sucede unos 60 minutos después de la primera liberación, aparece en respuesta al contacto directo de los nutrientes con las células L intestinales⁷, como ha sido demostrado al comparar la concentración plasmática de GLP-2 de pacientes sometidos a un test de tolerancia oral a la glucosa con la de aquellos a los que la administración de glucosa fue por vía intravenosa¹², lo que parece ser debido a que las células intestinales contienen receptores sensibles a diferentes tipos de nutrientes, incluyendo los receptores de los sabores umami y dulce, el receptor de ácidos biliares y los receptores de ácidos grasos libres^{9,13}. En relación a esto, se ha descrito en terneras alimentadas con leche suplementada con aceite de oliva, que las moléculas bioactivas que contiene parecen ser las responsables de la liberación de GLP-2, lo que ha sido corroborado en estudios in vitro con células enteroendocrinas en cultivo¹⁴. Estos resultados pueden dar aun mayor interés a los estudios sobre la dieta mediterránea.

La secreción de GLP-2 está incrementada en determinadas situaciones patológicas del intestino, tales como el síndrome de intestino corto, la derivación gástrica o la enfermedad inflamatoria intestinal¹⁵, y también en pacientes sometidos a cirugía bariática (diversión bileopancreática) para tratar la obesidad mórbida o la enfermedad de

Crohn^{16,17,18}, pero sus niveles postprandiales fueron significativamente menores en pacientes no diabéticos con obesidad mórbida y en diabéticos tipo 2 que en los individuos contro¹¹⁹. Menores niveles plasmáticos de GLP-2 en ayunas y después de la realimentación también han sido descritos en caballos con alteraciones en la respuesta a la insulina²⁰.

1.2. Estructura y metabolismo del GLP-2. Análogos del GLP-2

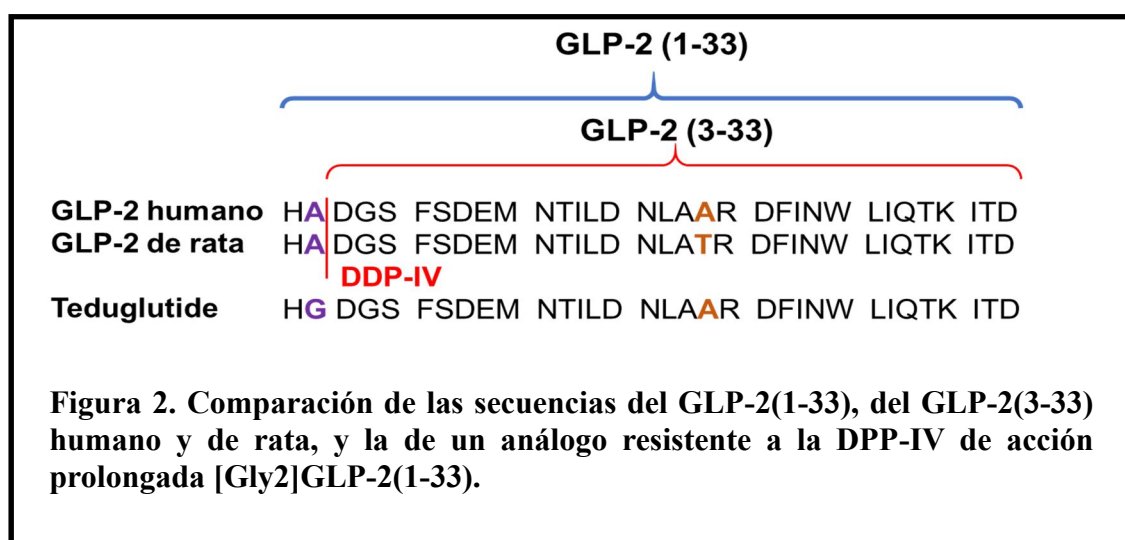
El péptido-2 relacionado con el glucagón (GLP-2) es una hormona peptídica de 33 aminoácidos, representado como GLP-2 (1-33), es cosecretada con el GLP-1 tras la ingesta de alimentos. El GLP-1 ejerce su efecto principal sobre las células endocrinas del páncreas, mientras que el GLP-2 actúa principalmente sobre el intestino delgado proximal.

La vida media en sangre de este péptido es de unos 7-8 minutos, debido a que es sustrato de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV), una serina proteasa ampliamente distribuida, pero especialmente abundante en los riñones, en el hígado y en el borde en cepillo de los enterocitos^{1,21}, por lo que posiblemente afecte a la función del GLP-2 antes de que se incorpore a la circulación²². La DPP-IV hidroliza el enlace peptídico entre la alanina-2 (o prolina) y cualquier otro aminoácido; al actuar sobre el GLP-2 (1-33), libera el dipéptido histidina-alanina y el GLP-2 (3-33), que es finalmente eliminado por aclaramiento renal. El GLP-2 (3-33), aunque ha mostrado ser un producto metabólico inactivo in vivo, puede actuar como un agonista potencial del GLP-2R con efectos antagonistas^{2,23,24}.

Para incrementar los efectos terapéuticos del GLP-2 se han empleado inhibidores de la DPP-IV y también análogos del GLP-2 resistentes a la acción de la dipeptidasa²⁵. Entre los inhibidores se encuentran un análogo de la endorfina-2 (Tyr-Pro-D-ClPhe-Phe-NH₂/EMDB-1) que, además de incrementar la vida media del GLP-2 in vitro, atenúa la colitis inducida por TNBS (ácido 2,4,6-Trinitrobenceno sulfónico) y por DSS (dextrano sulfato

sódico) en ratones²⁶ y el MK-0626 (oralmente activo), que ha mostrado ser una opción viable en la adaptación intestinal en pacientes con el síndrome de intestino corto²⁷.

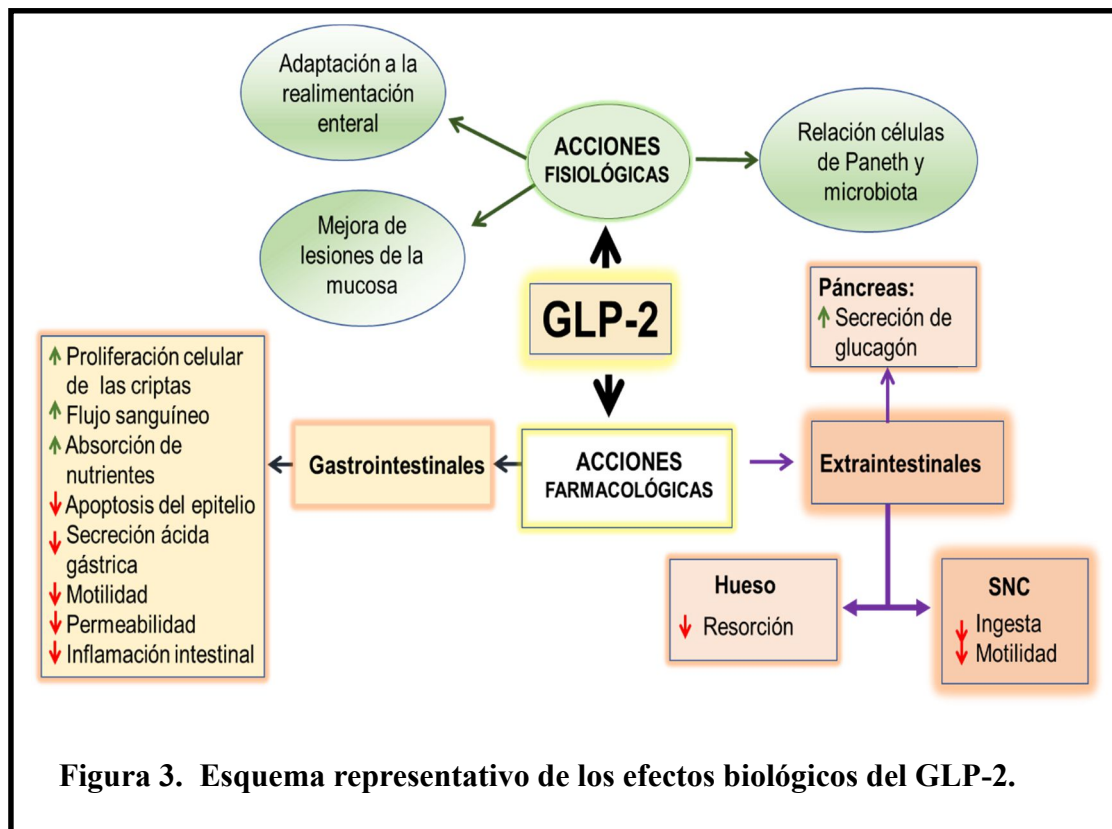
Puesto que la DPP-IV es muy específica, el cambio de la alanina o la prolina de la posición 2 del péptido por cualquier otro aminoácido origina un nuevo péptido resistente a la degradación potencialmente útil (**figura2**). Entre los análogos resistentes se encuentran, el [Gly²]-GLP-2 (teduglutide), el GLP-2{2} y el PEG-pGLP-2. El [Gly²]-GLP-2 cuya vida media en circulación es de 2-3 horas, se ha usado en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Crohn y de colitis ulcerosa, con el síndrome de intestino corto y fallo intestinal crónico²⁵ a los que reduce el tiempo de dependencia de la alimentación parenteral^{28,29} y mejora la absorción de monosacáridos al aumentar el tiempo del tránsito intestinal y disminuir la diarrea³⁰. No obstante, el uso del teduglutide está aún poco extendido debido al elevado coste material y humano que conlleva su tratamiento^{31,32}. El GLP-2{2} es un análogo dimérico del GLP-2, recientemente purificado y caracterizado, que presenta efectos más potentes que los del teduglutide contra el daño intestinal inducido por radiación³³. El PEG-pGLP-2, un derivado polietilenglicolado del GLP-2 porcino, cuya vida media es 16 veces superior a la de este, ha mostrado ser efectivo para aliviar el daño intestinal en ratones³⁴ y en el tratamiento de ratas con colitis ulcerosa³⁵.



2. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL GLP-2

2.1. Intestinales

El GLP-2 actúa casi exclusivamente en el intestino, promoviendo la adaptación de la mucosa intestinal a la realimentación enteral, así como mejorando la susceptibilidad del intestino delgado a las lesiones de la mucosa y la funcionalidad de las células de Paneth en relación a la interacción entre el huésped y la microbiota intestinal (**figura 3**). Además, el GLP-2 inhibe la motilidad intestinal y, en consecuencia, el tiempo disponible para la digestión y la absorción de nutrientes es mayor. Estas acciones son ejercidas bajo las condiciones fisiológicas de desarrollo, lactancia o regeneración del epitelio⁷.



La mayoría de los efectos biológicos por el tratamiento farmacológico con GLP-2 también han sido descritos en el tracto gastrointestinal, en donde aumenta la proliferación de las células de las criptas y reduce la apoptosis del enterocito. El aumento de la altura y el

espesor de las vellosidades y de la profundidad de las criptas produce la expansión de la mucosa proabsortiva de los intestinos delgado y grueso y, en consecuencia, el incremento de la absorción de nutrientes⁷ (**figura 3**). La administración de GLP-2 también incrementa la producción de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos^{37,38} y en humanos sanos, la secreción de quilomicrones es estimulada incluso 7 horas después de la comida, lo que implica a lípidos y apoB-48 previamente sintetizados y almacenados³⁹.

Por ello, se considera al GLP-2 como una hormona intestinotrópica que está involucrada en la *hipertrofia e hiperplasia del epitelio*^{40,41}. También como un agente terapéutico potencialmente útil para el tratamiento de trastornos derivados de *lesiones químicas, isquémicas y por radiación*^{7,22,42,43} y para prevenir la enteropatía inducida por la *terapia continuada con antiinflamatorios no esteroideos*^{44,45}.

La infusión continuada de GLP-2 ayuda a mejorar la adaptación intestinal que tiene lugar (a nivel histológico y metabólico) con posterioridad a los procedimientos quirúrgicos, incluyendo la *resección mayor del intestino delgado*^{46,47}. No obstante, la mayor complicación de la resección intestinal en humanos es el *síndrome de intestino corto* (SIC) y en estos pacientes, el tránsito intestinal no mejoró por el tratamiento prolongado con GLP-2⁴⁸.

Se ha descrito que el GLP-2 exógeno (administración IV o SC) y el endógeno (estimulada su secreción mediante una comida rica en hidratos de carbono y grasas)⁴⁹ producen un incremento del flujo sanguíneo en páncreas y en intestino proximal y también del volumen de sangre portal⁷, lo que, además de aumentar la absorción intestinal, favorece la proliferación celular. Asimismo, el GLP-2 revierte la atrofia intestinal asociada a la reducción del flujo sanguíneo^{2,50}, resultando una herramienta útil en la cirugía del aparato digestivo y en los trastornos de la microcirculación intestinal⁵¹ y al estimular la secreción de bicarbonato duodenal, puede mejorar la salud y la longevidad de la mucosa gástrica¹³.

Por otra parte, mediante la inhibición de neuronas excitadoras y la estimulación de neuronas inhibitoras, el GLP-2 inhibe la secreción de ácido gástrico, incrementa el flujo vascular mesentérico y reduce la motilidad intestinal⁴⁷. Asimismo, como la colecistoquinina, a través de reflejos vagales aferentes y de vías eferentes, el GLP-2 modula la homeostasis de la glucosa y las secreciones endocrinas intestinales^{7,52}.

En roedores normales y en modelos preclínicos de lesión intestinal, así como en pacientes con pancreatitis aguda, se ha demostrado que el GLP-2 disminuye la permeabilidad transcelular y paracelular del intestino y aumenta la función de la barrera intestinal, lo que da lugar a un mayor control del tránsito de líquidos e iones y también de macromoléculas^{7,21}. Se ha observado que terneras en periodo de lactancia, cuya respuesta a la secreción de GLP-2 inducida por nutrientes es baja, presentan alteraciones en la permeabilidad intestinal tanto frente a macromoléculas como a bacterias patógenas¹⁴. En este sentido, el GLP-2 parece mejorar la inmunidad intestinal innata y adquirida y prevenir la translocación bacteriana causada por la nutrición parenteral total⁵³, a la vez que mejora las alteraciones de la permeabilidad y la arquitectura intestinal, causadas por la progresiva restricción de alimentos⁵⁴ y previene, pero no revierte, el incremento de la permeabilidad intestinal y la toxicidad inducidos por la administración del lipopolisacárido (LPS) bacteriano⁵⁵. Estos efectos podrían ser debidos a la inhibición de la apoptosis o al alargamiento de las vellosidades causados por la acción proliferativa del GLP-2, lo que podría limitar el acceso físico de las macromoléculas a las regiones más profundas de las criptas cuyas uniones estrechas son más permeables que las situadas en otras zonas de las vellosidades⁵⁶.

2.2. Extraintestinales

Además de en el intestino, efectos del GLP-2 exógeno sobre otros órganos y tejidos también han sido descritos (**Figura 3**).

En páncreas, el GLP-2, estimula la liberación de glucagón en el suero de ratas ayunadas y en estado postprandial posiblemente aumente también la secreción de glucagón en humanos^{57,58}.

En hueso, el GLP-2 disminuye la resorción y promueve el anabolismo indirectamente como consecuencia del incremento de la absorción de nutrientes; además, estimula la diferenciación e incrementa la longevidad de los osteoblastos⁵⁹. En humanos, la inyección SC de GLP-2 disminuye la concentración sérica de s-CTX (Telopéptido C-terminal procedente de la degradación del colágeno tipo-1, marcador de la resorción osteoclástica), sin afectar los niveles de s-osteocalcina (marcador de la formación de hueso). También se ha descrito el efecto beneficioso del tratamiento con GLP-2 sobre el aumento de la masa ósea y la densidad mineral en pacientes con SIC y con osteoporosis^{60,61,62}.

El uso de análogos del GLP-2 tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de la aterosclerosis y de la enfermedad de hígado graso no alcohólica³⁷.

En la vesícula biliar de ratón, el GLP-2 induce la expresión de genes de respuesta inmediata y ejerce un efecto directo sobre su relleno, incluso en presencia de colecistoquinina⁶³.

No obstante, el mayor número de estudios sobre los efectos extraintestinales del GLP-2 han sido dirigidos a determinar su papel en el SNC.

En el hipocampo de rata, el GLP-2 redujo, sin afectar a la proliferación celular, el daño citotóxico inducido por el glutamato⁶⁴.

La administración intracerebroventricular de GLP-2 a roedores, y la consiguiente activación de los receptores hipotalámicos, produjo diversas acciones a nivel intestinal,

incluyendo una disminución de la ingesta de alimentos, de la motilidad intestinal y del vaciado gástrico⁶⁵. Por el contrario, el bloqueo de las acciones del GLP-2 en ratones mediante la delección selectiva del gen del GLP-2R en las neuronas POMC (proopiomelanocortina) produjo hiperfagia, inicio retrasado de obesidad y un acelerado vaciado gástrico. Estas observaciones parecen sustentar la hipótesis de que el GLP-2 puede tener un papel en la regulación de la ingesta alimentaria y del peso corporal⁵².

Aunque el GLP-2 no tiene efectos directos sobre la secreción de insulina⁶⁶, estudios recientes indican que la activación de los GLP-2R de las neuronas POMC hipotalámicas parece estar implicada en el control del metabolismo de la glucosa, ya que la administración intracerebroventricular de GLP-2 en ratones mejoró la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y suprimió la producción hepática de glucosa. Además, la eliminación selectiva del GLP-2R disminuyó la tolerancia postprandial y aumentó la resistencia hepática a la insulina⁶⁷. Actualmente se considera que el GLP-2 tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa, confirmado por la diferente respuesta obtenida en ratones alimentados con dietas ricas en grasa tratados con GLP-2 (3-33) o con teduglutide⁹.

Finalmente, se ha descrito que la inyección de GLP-2 a ratones con demencia vascular mejoró significativamente la capacidad de aprendizaje y de memoria⁶⁸ y que su administración bien por vía intracerebroventricular⁶⁹ o intranasal⁷⁰ produjo efectos antidepressivos en ratas. Tales resultados abren un nuevo camino para el uso del GLP-2 en pacientes con trastornos de conducta y/o aprendizaje que podrían tener especial relevancia en el futuro.

2.3. El receptor de GLP-2 (GLP-2R)

2.3.1. Estructura y localización subcelular del GLP-2R

Las acciones biológicas del GLP-2 están mediadas por un receptor (GLP-2R), cuyo gen humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.3) y codifica una proteína de 553 aminoácidos^{7,50}. La expresión del ARNm/GLP-2R ha sido extensamente estudiada en el tracto digestivo del ratón, siendo elevada su concentración en las capas musculares circular y longitudinal del **estómago** no glandular y poco abundante en la parte glandular. En el **duodeno**, la expresión fue elevada en la lámina propia de la mucosa y en las capas musculares circular y longitudinal, menos abundante en el plexo nervioso del duodeno caudal y ausente en las glándulas de Brunner. En los **intestinos medio y distal**, la expresión fue elevada en células dispersas dentro de la mucosa y el plexo nervioso y poco abundante en las células musculares. En el **intestino grueso** (ciego y colon), el ARNm/GLP-2R fue determinado en la mucosa y en los plexos nervioso, mesentérico y submucoso⁷¹.

A nivel de proteína, el GLP-2R se expresa en pequeña cantidad en el pulmón, cuello uterino y las fibras aferentes vagales de varias especies^{50,72}; en corazón de ratas Wistar⁷³, pero no en el de ratas Sprague Dawley ni en el de ratones C57BL/6²; en hígado⁷⁴ y en la vesícula biliar del ratón⁶³. También en islotes aislados de ratón, en cultivos de células alfa y beta de roedores y en cultivos de células beta humanas⁷⁵; en el tejido adiposo epicardial de pacientes con enfermedad de la arteria coronaria y en diabéticos tipo 2 sometidos a cirugía cardíaca¹⁵.

Por el contrario, la expresión del GLP-2R es muy abundante en varias regiones del SNC (tálamo, hipocampo, corteza cerebral, rombencéfalo, núcleo hipotalámico dorsomedial compacto), en los miofibroblastos subepiteliales (SEMFs), en diversas células

neuroendocrinas y en neuronas entéricas del tracto gastrointestinal (particularmente en el fundus gástrico y en el colon) de diversas especies, incluyendo ratón, rata, cerdos y humanos^{50,72}. Sorprendentemente, GLP-2R no está presente en las células epiteliales (enterocitos), a pesar de ser sobre estas células donde el GLP-2 ejerce sus bien conocidas funciones proliferativa y citoprotectoras^{50,72}.

La expresión del GLP-2R intestinal es muy baja durante el ayuno y se incrementa por la alimentación continuada con dietas ricas en grasa^{76,77}. Asimismo, está significativamente incrementada en las células principales (zimogénicas o peptídicas) gástricas de pacientes obesos con y sin diabetes⁷⁸.

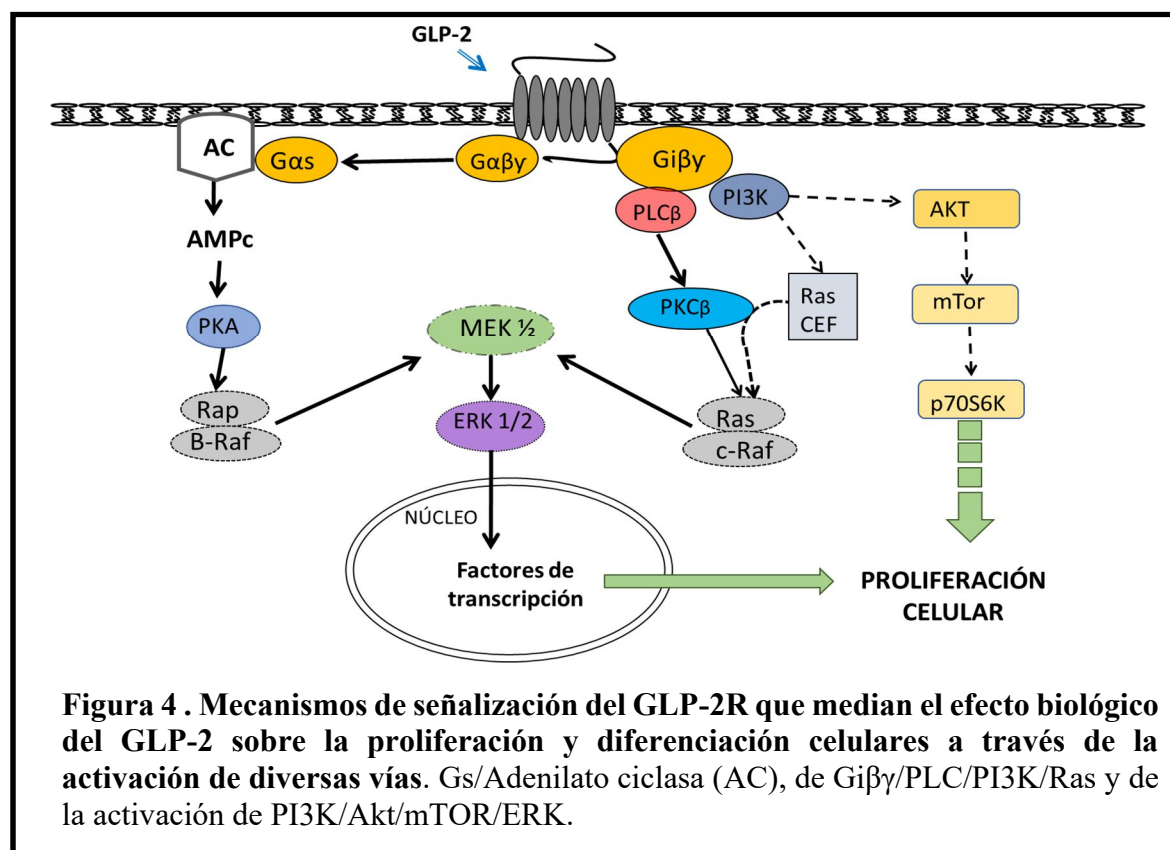
2.3.2. Sistemas de transducción de señales acoplados al GLP-2R

El GLP-2R humano procedente de intestino e hipotálamo ha demostrado ser altamente selectivo para su ligando específico, pues sólo responde, aunque muy débilmente, a altas concentraciones de los péptidos estructuralmente relacionados, glucagón, GLP-1 y GIP (polipéptido insulínotropo dependiente de glucosa)⁷⁹.

El GLP-2R es un miembro de la superfamilia de receptores 7-hélices transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) y su activación promueve principalmente la vía de señalización iniciada por la activación de la adenilato ciclasa, la producción de AMPc y la activación de la PKA^{80,81}, pero también puede incrementar los niveles de calcio intracelular, o actuar a través de la activación de $G_i\beta\gamma$ /PLC/PI3K/Ras^{50,81}, o de la señalización mediada por PI3K/Akt/mTOR/ERK⁸² (**figura 4**), regulando la expresión de genes de respuesta temprana implicados en la supervivencia y proliferación celulares^{83,84}.

El GLP-2 ejerce sus efectos antiapoptóticos mediante la inhibición de las actividades de las caspasas-3, -7, -8 y -9, bien a través de la activación de determinados miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (especialmente Bcl-XL, célula-B de linfoma extra larga),

de la inhibición de ciertos miembros proapoptóticos de esa misma familia (especialmente BAD, promotor de muerte asociado a Bcl-2), o bien a través del aumento de la producción de los inhibidores de caspasas, XIAP (proteína inhibidora de apoptosis ligada a X) y cIAP (inhibidor celular de la apoptosis) ^{85,86}.



Como es el caso de muchos receptores acoplados a proteínas G, el GLP-2 está sujeto tanto a la desensibilización homóloga como a la heteróloga. Sin embargo, en cuanto a la endocitosis/internación existen ciertas diferencias con respecto a los miembros de esta superfamilia. Normalmente, esta comienza con la fosforilación de los dominios intracelulares, la unión a moléculas de β-arrestina, el desacoplamiento de las proteínas G y la internación del receptor a través de depresiones revestidas de clatrina. En el caso del GLP-2R parece que la endocitosis tiene lugar mayoritariamente mediante la formación de balsas lipídicas y que podría estar mediada por la caveolina. Después, los endosomas formados

pueden volver a la superficie con el fin de reciclar el receptor (**figura 5**), o fusionarse con lisosomas, en cuyo caso se promovería su degradación^{87,88}.

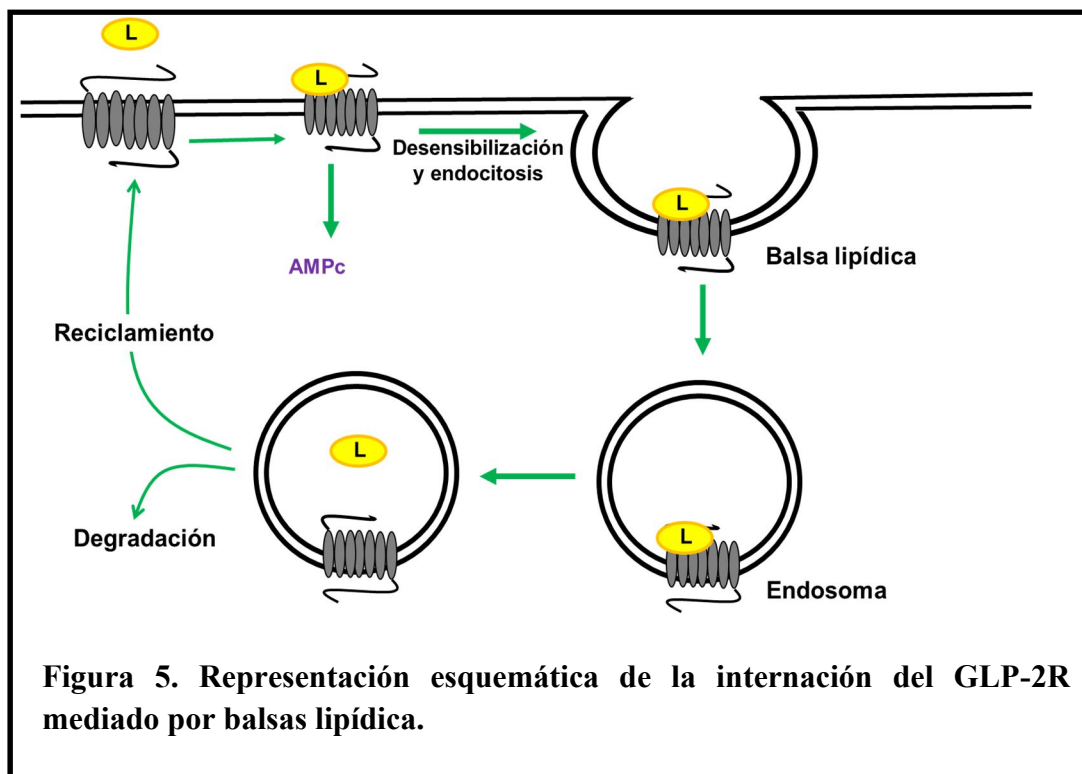
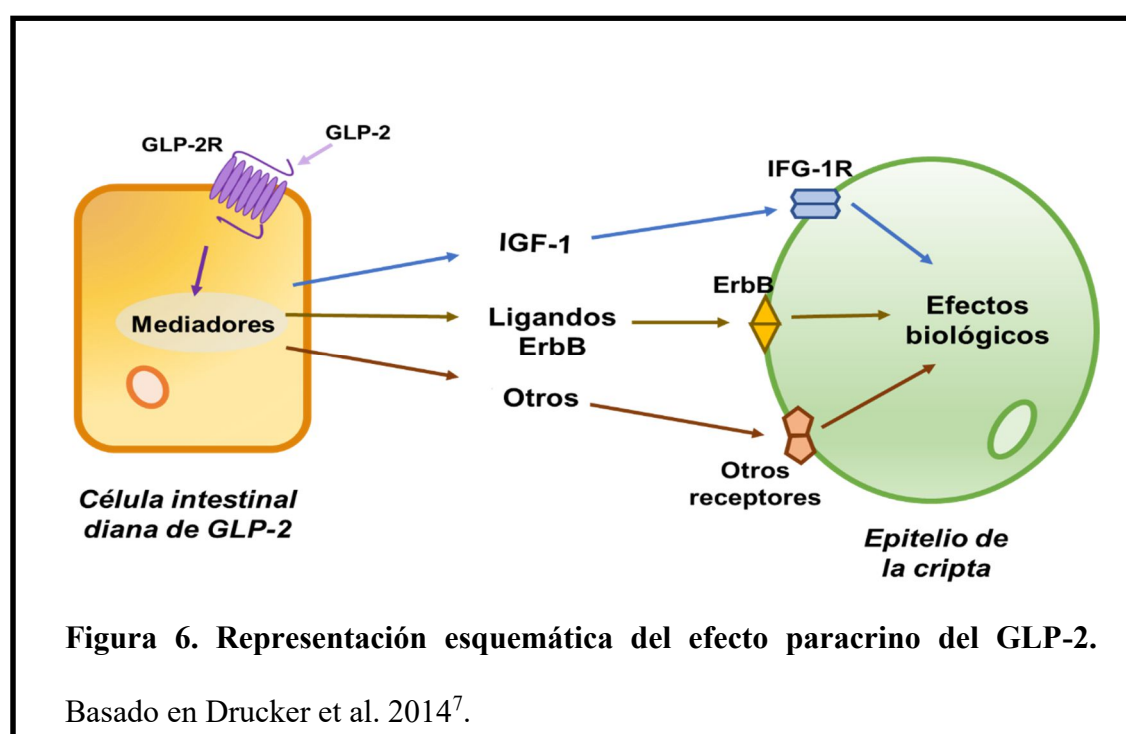


Figura 5. Representación esquemática de la internación del GLP-2R mediado por balsas lipídicas.

2.3.3. Mediadores extracelulares implicados en las respuestas biológicas al GLP-2

Puesto que las células epiteliales del intestino no expresan el GLP-2R, se sugirió que en la respuesta fisiológica al GLP-2 debería participar algún tipo de señal indirecta liberada por células de su entorno que expresarían el GLP-2R y que, a través de un mecanismo paracrino, alcanzaría los enterocitos (**figura 6**). En la actualidad, diferentes factores han sido identificados como mediadores de los efectos biológicos del GLP-2 en el intestino, incluyendo: **IGF-1** (factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I) y **KGF** (factor de crecimiento de queratinocitos), implicados en la proliferación de las células de las criptas del intestino delgado y en la proliferación de colon, respectivamente; **VEGF** (factor de crecimiento endotelial vascular) y **TGF- β** (factor de crecimiento transformante 1), envueltos en los procesos de reparación del intestino; **NO** (óxido nítrico), implicado en el

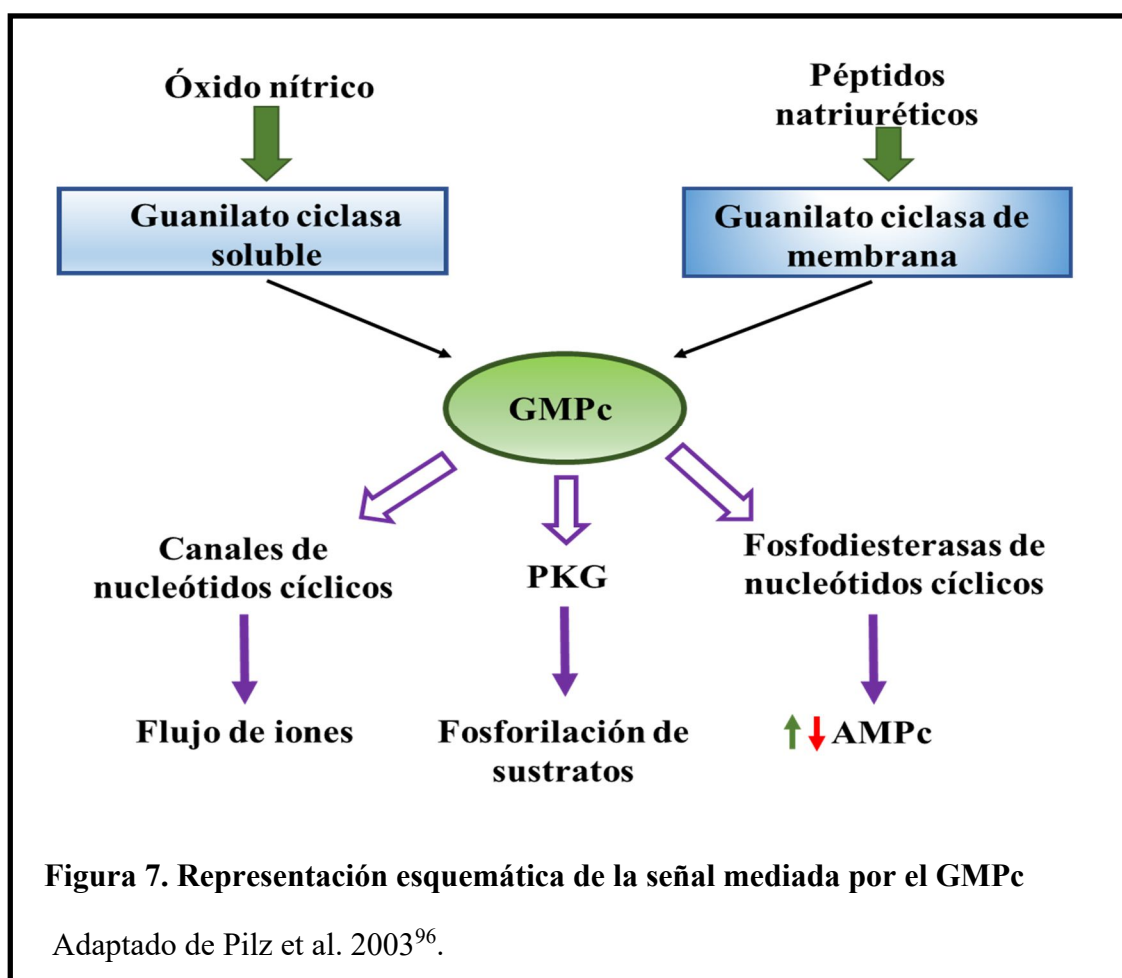
aumento del flujo sanguíneo hacia el tracto gastrointestinal; **VIP** (péptido intestinal vasoactivo), involucrado en muchos efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos; **TLRs** (receptores semejantes a Toll), responsables de los procesos inflamatorios y de los cambios en la expresión de las uniones estrechas que participan en la permeabilidad intestinal inducidos por los cambios en la microbiota. Además, ciertos ligandos de **EGF-R (ErbB)** (miembros de la familia del **EGF** (factor de crecimiento epidérmico) también parecen estar involucrados en las acciones del GLP-2 sobre el crecimiento y la diferenciación celulares^{7,22,44,82,89,90,91,92,93,94}.



3. EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADO POR EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc)

Además de las vías señalizadoras mencionadas, el GLP-2 puede interaccionar con la red de señales generadas por el GMPc. Desde que fuera identificado en la orina de rata⁹⁵, se ha descrito que este segundo mensajero regula la expresión de múltiples genes, incluyendo algunos implicados en la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celulares, o en la hipertrofia cardíaca y en el tono vascular⁹⁶ y también en procesos tales como la contractilidad, la secreción y el transporte iónico⁹⁷.

En las células cerebrales, incluyendo los astrocitos, el NO es un subproducto de la conversión de L-arginina en L-citrulina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS)⁹⁸. Las isoformas neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS) son calcio-dependiente y constitutivamente expresadas, mientras que la inducible (iNOS) es calcio independiente y su expresión aumenta en las células expuestas a estímulos inmunológicos e inflamatorios⁹⁹. El NO inicia una cascada de transducción de señales intracelulares que pasa por el incremento de la producción de GMPc. A su vez, los efectos biológicos del GMPc son mediados por las proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG), las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) y los canales de nucleótidos cíclicos (**figura 7**)¹⁰⁰.



3.1. Guanilato ciclasa: Tipos, localización. Composición, estructura y mecanismos de acción

Las enzimas responsables de la formación del GMPc a partir de GTP, denominadas guanilil/guanilato ciclasas, están presentes en diversos tejidos animales^{101,102,103}. Se han descrito dos isoformas: una, en la fracción soluble/citosólica y la otra, en la fracción particulada/membrana^{104,105}. Ambas son consideradas receptores activados por ligandos específicos.

Las Guanilato ciclasa de membrana (siete isoformas en ratón y cinco en humanos, codificadas por distintos genes) se presentan como homodímeros de unos 1050 aminoácidos, son activadas por los miembros de la familia de los péptidos natriuréticos y constan de: *dominio de unión a ligando* (extremo N-terminal extracelular), *región transmembrana* y el extremo C-terminal intracelular, que contiene una *secuencia* que

presenta *homología con proteína quinasas*, la *región de dimerización* y el *dominio catalítico* productor de GMPC⁹⁷.

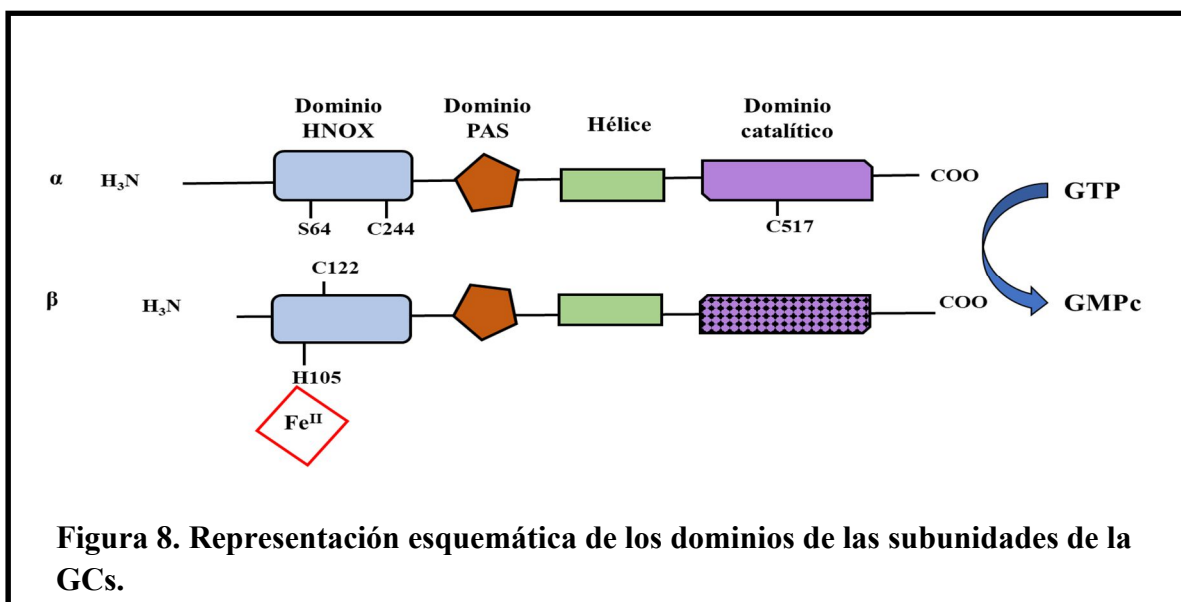
La GCs puede ser estimulada por radicales libres, nitrovasodilatadores y otras moléculas similares capaces de difundir a través de las membranas celulares^{106,107}, incluyendo el óxido nítrico (NO), su principal ligando^{100,108}.

La GCs está implicada en importantes aspectos de la homeostasis vascular, como la relajación del tono y la vasodilatación^{109,110}, pero también en el desarrollo neural, el crecimiento dendrítico y axonal y la sinaptogénesis¹¹¹.

La GCs es una enzima heterodimérica de la que han sido clonadas y secuenciadas cuatro subunidades (α_1 , α_2 , β_1 y β_2), pero solo los heterodímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ constituyen enzimas funcionalmente activas¹¹². Las subunidades α_1 y β_1 (de 690 y 619 aminoácidos, respectivamente) (**FIGURA 8**) constan de: *Dominio de unión hemo-óxido nítrico y oxígeno (HNOX)*, situado en el extremo amino; la subunidad β_1 contiene un grupo hemo (ligado a la H105) que puede unir NO, CO y O₂. La *Región central* contiene dos dominios con funciones poco conocidas: un *dominio de estructura similar a PAS*, que podría mediar interacciones entre proteínas y un *dominio de estructura helicoidal* que podría estar implicado en la formación del heterodímero funcional. *Dominio catalítico*, la región más conservada, situado en el extremo C-terminal. Este dominio presenta un alto grado de homología entre las subunidades α_1 y β_1 de las guanilato ciclasa solubles, pero también con los dominios catalíticos de las guanilato ciclasas de membrana y de las adenilato ciclasas¹¹⁰ (**figura 8**). No obstante, la estructura tridimensional del heterodímero completo (estructura cuaternaria) aún no se conoce completamente^{113,114}.

La activación de la GCs se produce por la unión del NO al ión ferroso del grupo hemo de la subunidad β_1 , esto origina un cambio conformacional en la estructura del heterodímero que produce la activación del dominio catalítico. La actividad catalítica de la

GCs es inhibida mediante la N-nitrosación de los grupos tiol de las cisteínas C244 y C517 de la subunidad $\alpha 1$ y C122 de la subunidad $\beta 1$ causada por exceso de NO¹¹² y por fosforilación de la S64 de la subunidad $\alpha 1$ ¹¹⁵ (figura 8).



3.2. Localización subcelular de las subunidades alfa 1, beta 1 y alfa 2 de la GCs. Efectos independientes del GMPc.

Las dos formas heterodiméricas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ se coexpresan en la mayoría de los tejidos, si bien su nivel de expresión depende del tejido. Mientras que en el sistema cardiovascular y el pulmón la forma predominante es la $\alpha 1\beta 1$, siendo mucho menor la $\alpha 2\beta 1$, el cerebro parece ser el único tejido en donde los dos heterodímeros se expresan casi en la misma proporción¹¹⁶.

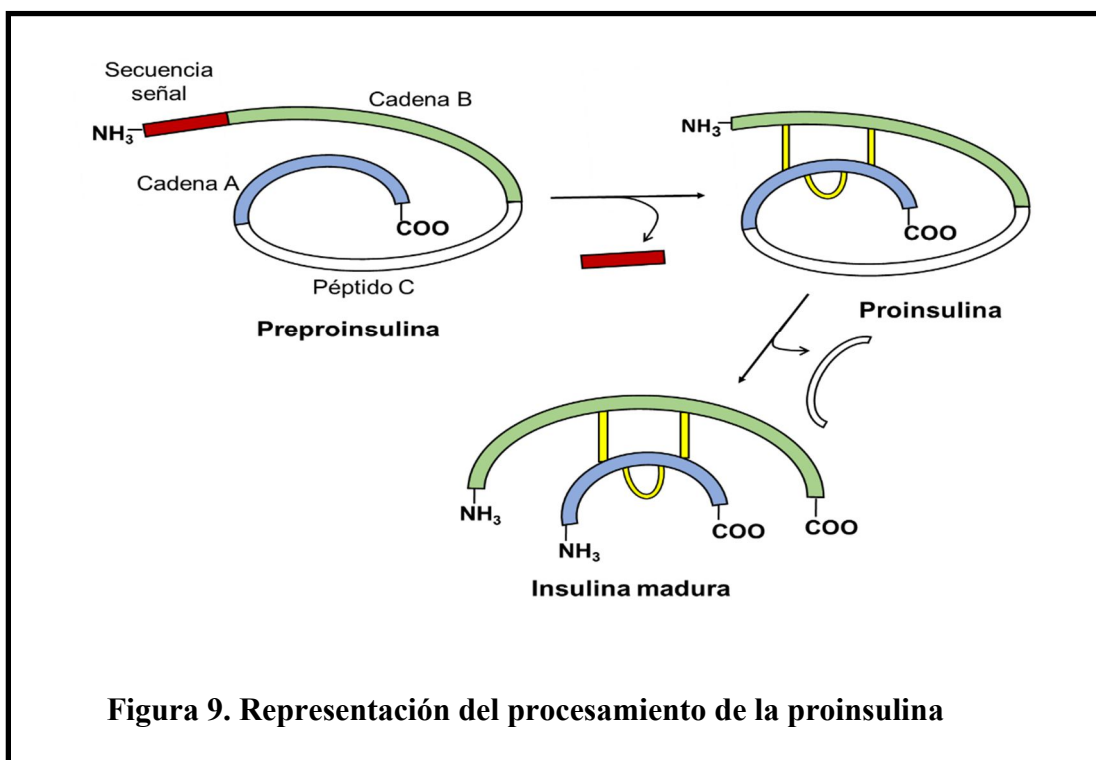
Diversos trabajos han demostrado que cuando las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ o $\beta 1$ son sobreexpresadas, además de los heterodímeros, pueden formarse homodímeros (enzimáticamente inactivos)^{117,118}. También se ha demostrado la existencia de subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ independientes en tejido embrionario cerebral de rata¹¹⁹. Estas subunidades además pueden unirse a otras proteínas. Se ha sugerido que estas formas no heterodimerizadas

pueden tener funciones independientes de la señal del GMPc. Por ejemplo, la subunidad $\alpha 1$ parece actuar como un mediador importante del efecto procarcinogénico de los andrógenos¹²⁰. El gen que codifica para esta subunidad es una diana directa del receptor de andrógenos (AR) y media el crecimiento y la supervivencia de las células de cáncer de próstata AR-positivas. La función de la subunidad $\alpha 1$ en el cáncer de próstata es independiente de la señal del NO. La subunidad $\alpha 1$ se asocia físicamente y secuestra en el citosol a la proteína p53 previniendo la apoptosis dependiente de p53 de las células cancerosas y promoviendo así su supervivencia y proliferación¹²¹. Esta subunidad puede unirse además a otras proteínas implicadas en el transporte nuclear de p53¹²². Por otro lado, se ha descrito en astrocitos de cerebelo en cultivo y en la línea celular C6 que la subunidad $\beta 1$ puede traslocarse desde el citosol al núcleo y asociarse con los cromosomas durante la mitosis, por lo que se ha propuesto que la $\beta 1$ es una proteína multifuncional que regula la condensación de la cromatina y la progresión del ciclo celular, además de formar parte del heterodímero de la guanilato ciclasa¹²³. Una característica especial de la subunidad $\alpha 2$ es que contiene en su extremo carboxilo terminal una secuencia de unión a motivos PDZ (PSD-95/disc large/zonula occludens). Los motivos PDZ son secuencias formadas por 100 aminoácidos aproximadamente; están presentes en varias proteínas, algunas de ellas pertenecientes al citoesqueleto. Funcionan como adaptadores moleculares y contribuyen a la formación de complejos proteicos mediante la interacción del motivo PDZ de una proteína con el extremo carboxilo de su ligando diana. Mediante la interacción de la subunidad $\alpha 2$ con la proteína PSD-95, el heterodímero $\alpha 2\beta 1$ pudo ser aislado en la fracción de membrana de sinaptosomas obtenidos a partir de cerebro de rata¹²⁴. Más recientemente, mediante el empleo de técnicas inmunofluorescentes en células HEK293 (embrionarias de riñón humanas) se ha localizado el heterodímero $\alpha 2\beta 1$ en la membrana celular asociada con la nectina, una proteína importante en la adhesión celular y en las interacciones célula a

célula. La asociación es indirecta y tiene lugar mediante la interacción del extremo C-terminal de la $\alpha 2$ con el dominio PDZ de una proteína de andamiaje implicada en los procesos de adhesión y polaridad celular¹²⁵.

4. INSULINA: ESTRUCTURA, MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS

En humanos sólo hay un gen para la insulina situado en el brazo corto del cromosoma 11¹²⁶, que se expresa en las células β de los islotes pancreáticos, y que codifica para la preproinsulina, una proteína de 104 aminoácidos (aa). El procesamiento postraduccional en el retículo endoplásmico escinde el péptido señal, originando la proinsulina de 84 aa que adopta la estructura terciaria, incluyendo los 3 puentes disulfuro. En el aparato de Golgi se elimina, mediante proteólisis, el denominado péptido C y la insulina madura, de 51 aa, se empaqueta en vesículas de secreción. La hormona funcionalmente activa consta de dos cadenas: la cadena A, de 21 aa, tiene un puente disulfuro interno y otros dos que la unen a la cadena B, de 30 aa¹²⁷(figura 9).

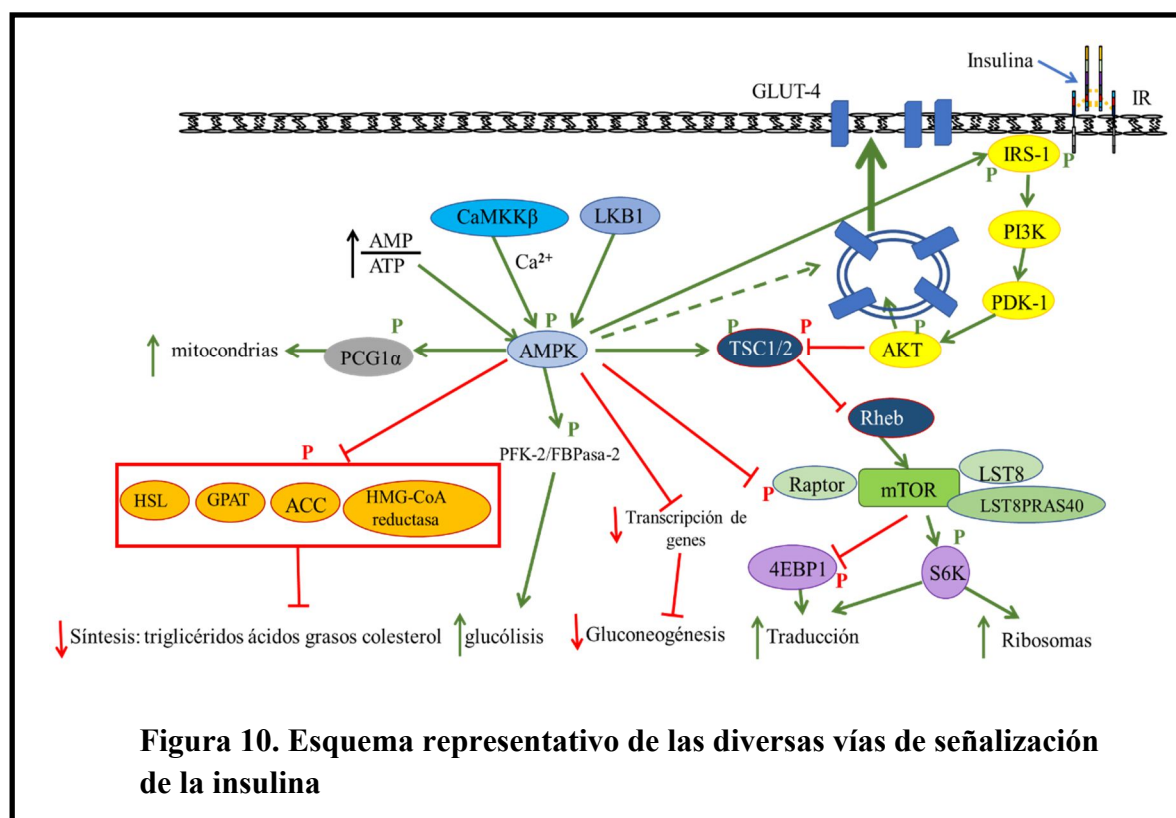


4.1. Origen de la insulina cerebral

El origen de la insulina presente en el cerebro, así como su mecanismo de acción y efectos biológicos ha sido recientemente revisada por Blázquez y col. (2014)¹²⁸. En la actualidad se considera que la insulina cerebral podría tener un doble origen: periférico y central. La procedencia periférica de la insulina implicaría la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)¹²⁹ o de entrar a través de los órganos circunventriculares (incluyendo el área postrema, estrechamente relacionado con el núcleo del tracto solitario y con el núcleo motor dorsal del nervio vago) que, al carecer de aquella, existe comunicación directa entre el cerebro y la circulación sanguínea¹³⁰. Dado que la concentración de insulina en el cerebro no es proporcional a su concentración en sangre^{131,132,133} y que varía dependiendo del estadio del crecimiento y desarrollo cerebral¹³⁴, se asume que la insulina penetra en el cerebro a través de un sistema de transporte específico. Pese a que no se conoce con exactitud, esta función transportadora parece ser llevada a cabo por los propios receptores de insulina (IR)¹³⁵ ya que muestran características fisicoquímicas (saturabilidad, especificidad, afinidad, inmunoneutralización, interacciones cooperativas y cinética de disociación) similares a las de dichos receptores¹³⁶. Por otro lado, se ha descrito que: cultivos primarios de células neuronales procedentes de cerebro de rata liberan insulina¹³⁷; en cerebros de cadáveres humanos, las concentraciones de insulina inmunoreactiva y péptido-C son más elevadas que en la sangre¹³⁸; además, en ciertas áreas cerebrales de rata y de conejo se expresa el ARNm de la insulina^{139,140} y, por último, parece existir una relación directa entre la concentración de insulina y la de sus receptores en el cerebro¹⁴¹. Todo ello, podría estar de acuerdo con el posible origen central de la insulina cerebral.

4.2. Mecanismo de acción. Receptores de insulina

El receptor de insulina media todas las acciones biológicas de esta hormona en el cerebro. En humanos, existe un único gen que codifica para los receptores de insulina. Está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19p13.2–19p13.3) y consta de 22 exones. En el cerebro de otros mamíferos adultos se han descrito dos tipos de receptor: el IR-B, la isoforma más larga, localizada en células gliales (y que está también presente en los tejidos periféricos) y el IR-A, más corto al no expresar el exón 11, que es específico de neuronas. Se ha propuesto que el IR neuronal en lugar de estar implicado en el metabolismo de la glucosa, lo estaría en funciones propias del cerebro, como la actividad sináptica necesaria para el aprendizaje y la memoria ^{142,128}. La transducción de señales inducidas por la insulina en el cerebro es similar a la que tiene lugar en los tejidos periféricos y de forma resumida se representa en la (figura 10).



4.3. Efecto de la insulina en el cerebro

Claude Bernard describió en 1855 que los perros con el cuarto ventrículo dañado presentaban una marcada glucosuria y propuso que el cerebro debía jugar un papel primordial en la regulación de la homeostasis de la glucosa¹⁴³. En 1921, Banting y Best mostraron la relación entre la secreción pancreática de insulina y la concentración de glucosa en sangre y propusieron el papel de la insulina a nivel de tejidos periféricos, pero no reconocieron la importancia que esta hormona pudiera tener en el sistema nervioso central^{144,145}. En 1978 se describió por primera vez la presencia de insulina en el cerebro de rata¹⁴⁶ y solo después de comprobarse que su concentración en el cerebro humano era muy superior a la de los tejidos periféricos¹³⁸, se comenzó a considerar a la insulina como un factor de gran importancia en la fisiología cerebral^{147,148}. Otro de los momentos clave en el estudio de las funciones de la insulina a nivel cerebral fue cuando se observó que ratones con deficiencia en la expresión del gen del receptor de insulina desarrollaron resistencia a la insulina a nivel de todo el organismo, asociada con dislipemia e hiperinsulinemia que finalmente cursó con obesidad¹⁴⁹. Además, la administración intracerebroventricular de insulina a roedores y primates no humanos produjo una disminución de la ingesta y del peso corporal, lo que permitió destacar la importancia de la insulina a nivel cerebral en relación con el comportamiento alimentario^{150,151,152}. Por otra parte, la administración central de insulina también parece tener efectos a nivel periférico, puesto que la administración directa de insulina en el hipotálamo suprimió la producción de glucosa hepática en los ratones control, pero no en los ratones con deficiencia en la expresión del gen del receptor de insulina^{149,153,154}.

5. PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN EL CEREBRO/SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Ya en 1899, Santiago Ramón y Cajal se hacía la siguiente reflexión “*¿Qué significación funcional debemos otorgar a la neuroglía? Desgraciadamente, en el estado actual de la ciencia no es posible contestar a la importante pregunta más que mediante conjeturas más o menos racionales. En presencia de este problema, el fisiólogo se halla, por falta de métodos, totalmente desarmado*”^{155,156}. Unos años antes, en 1895 ya había propuesto que su papel fundamental no era el de soporte “*¿Qué van a sostener corpúsculos pequeñísimos, aislados, flexibles, delicadísimos, mucho más delicados y pequeños que las células nerviosas mismas?*”^{157,156} y en 1913 hipotetizó que “*La neuroglía de la sustancia gris vendría a constituir una vasta glándula endocrina intercalada entre las neuronas y plexos nerviosos, destinada quizás a elaborar hormonas asociadas a la actividad cerebral*”^{158,156}. Sin embargo, hasta hace pocas décadas la comunidad científica consideraba que los astrocitos solo servían de soporte al sistema nervioso central. Hoy se sabe que los astrocitos constituyen el componente principal de la glía y representan el tipo celular más abundante en el cerebro y que desempeñan papeles fundamentales en la regulación de la función neuronal y la remodelación de las estructuras sinápticas (para modular la excitabilidad del cerebro) mediante la liberación de moléculas específicas, denominadas gliotransmisores o la regulación del flujo sanguíneo^{159,160}. Todo ello parece indicar que los astrocitos son importantes reguladores de las funciones cognitivas¹⁶¹. Se ha propuesto que los astrocitos funcionan como los sensores metabólicos del sistema nervioso central (SNC), pues parecen detectar y responder no sólo a los cambios de concentración de diferentes sustratos y productos metabólicos presentes a nivel del parénquima cerebral, sino también a ciertas hormonas circulantes que modulan la actividad de los circuitos neuronales¹⁶². Por ello, los astrocitos juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis

metabólica del cerebro¹⁶³. Efectivamente, los astrocitos mantienen la homeostasis del cerebro mediante la regulación de los sistemas de neurotransmisión, de las defensas antioxidante y antiinflamatoria¹⁶⁴ y del metabolismo energético, ya que, además de actuar como sensores fisiológicos de la oxigenación cerebral (el sensor de hipoxia ha sido situado en la mitocondria)¹⁶², son los principales responsables de la captura y del metabolismo de la glucosa en el cerebro¹⁶⁵.

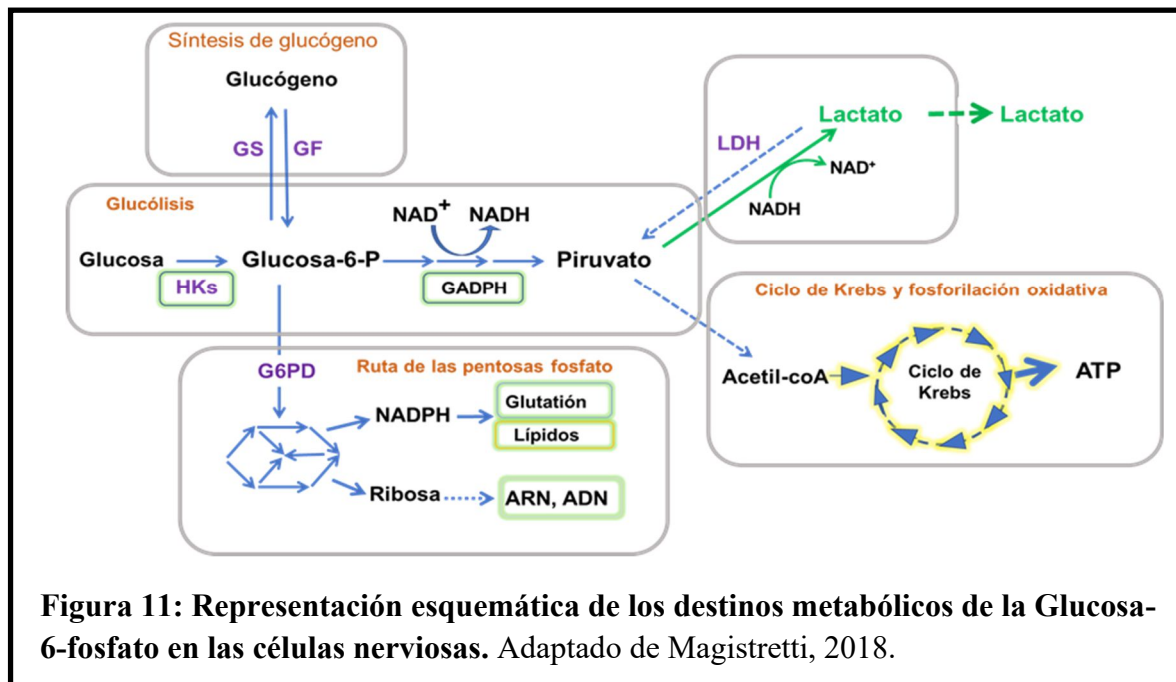
5.1. Papel de la glucosa en las células nerviosas

La glucosa es el sustrato energético obligado para el cerebro, el órgano que más energía consume con respecto a su peso¹⁶⁶. El metabolismo de la glucosa es diferente para cada tipo celular del S.N. En las neuronas predomina el metabolismo oxidativo mientras que en los astrocitos la glucosa se metaboliza a piruvato/lactato con un menor rendimiento energético. La glucosa entra en las células nerviosas por un proceso facilitado por varios transportadores, GLUT-1 y 3 fundamentalmente. El GLUT-1 presenta dos isoformas, una glicosilada que se expresa en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y otra de menor tamaño molecular que lo hace en astrocitos. El GLUT-3 se encuentra mayoritariamente en las neuronas y en menor medida en los astrocitos¹⁶⁷.

El primer evento que tiene lugar tras la entrada de la glucosa en las células es su fosforilación por la hexoquinasa a glucosa-6-fosfato (G6P). El procesamiento de la G6P tiene lugar de acuerdo con las diferentes funciones desempeñadas por la glucosa en cada tipo celular; por ejemplo, puede convertirse en glucógeno, proceso que ocurre exclusivamente en los astrocitos^{168,169} (**figura 11**).

De acuerdo con el papel de la glucosa como principal sustrato energético en el sistema nervioso, la G6P, tras su conversión a piruvato, puede seguir la ruta de la glucólisis

oxidativa (ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa). Esta vía es la que genera mayor rendimiento energético y tiene lugar de forma mayoritaria en las neuronas¹⁶⁹.



El piruvato puede ser convertido en lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), proceso mayoritario o exclusivo de los astrocitos. Según la hipótesis de la lanzadera del lactato (ANSL), el lactato sintetizado por los astrocitos lo utilizan las neuronas como precursor energético. Este proceso asume que los astrocitos capturan mayor cantidad de glucosa de la requerida para su propio consumo, la almacenan en forma de glucógeno y la ceden a las neuronas en forma de lactato, lo que resalta el papel de los astrocitos como sustento de la función neuronal¹⁶⁹.

Por último, la G6P puede entrar en la ruta de las pentosas fosfato. Esta vía genera poder reductor (NADPH) necesario para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, importantes para los procesos de proliferación celular y para el mantenimiento del glutatión en su forma reducida; esto último representa un importante mecanismo de defensa de las células frente a la toxicidad producida por el peróxido de hidrógeno¹⁷⁰.

5.2. Expresión del receptor de GLP-2 en astrocitos de rata en cultivo

Debido a la dificultad de obtener células diana (cultivos primarios o bien líneas celulares) que expresaran el GLP-2R endógeno y respondieran al ligando, los primeros estudios sobre el mecanismo de transducción de señales mediadas por este receptor fueron realizados en diversas líneas celulares transfectadas con el GLP-2R humano o de rata^{24,79,80,171,172}.

Los efectos biológicos del GLP-2 sobre un tipo celular que expresara el propio receptor endógeno fueron descritos por primera vez por Velázquez y colaboradores en 2003¹⁷³. Mediante RT-PCR y Southern blotting, se determinó la expresión del gen del GLP-2R en astrocitos procedentes de corteza cerebral de neonatos de rata. Además, este receptor demostró ser funcional, puesto que las células respondieron al GLP-2 produciendo AMPc. Posteriormente se observó que el ARNm/GLP-2R podía estar regulado por ligandos como el GLP-2 o el IGF-1¹⁷⁴.

5.3. Efectos biológicos del GLP-2 sobre los astrocitos de rata en cultivo

Ha sido descrito previamente por nuestro grupo, mediante la aplicación de varias técnicas experimentales, como la citometría de flujo, la incorporación de ³H-timidina al ADN o la tinción con cristal violeta, junto con técnicas de inmunotransferencia (western blotting) empleando anticuerpos dirigidos contra marcadores de la proliferación (c-FOS, PCNA y pKi67) y diferenciación (GFAP) celulares, que el GLP-2 promovía la proliferación y la diferenciación de los astrocitos en cultivo^{174,175}. Además, se demostró que el GLP-2 presentaba un efecto sinérgico con ciertos factores de crecimiento (EGF, PDGF, IGF-1) y con la insulina, hormona anabólica por excelencia, que también promovían la proliferación de los astrocitos^{174,175}. Este efecto sinérgico parecía tener lugar a través de la activación de

la vía de las MAP quinasas en lugar de a través de la estimulación del AMPc¹⁷⁴. Por otra parte, también se demostró que el GLP-2 redujo la producción de GMPc y modificó la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ de la GCs¹⁷⁶.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hoy se reconoce que los astrocitos tienen un papel fundamental en la fisiología del sistema nervioso central y podrían también tenerlo en determinadas situaciones patológicas, tales como la diabetes, la inflamación y la neurodegeneración. Algunas de estas patologías parecen estar asociadas con la proliferación celular y con ciertas alteraciones del metabolismo de la glucosa, en donde la insulina desempeña un papel esencial. Por otro lado, se ha descrito que el GLP-2 induce la proliferación de los astrocitos en determinadas condiciones. Sin embargo, el efecto de la variación de la concentración de glucosa sobre la proliferación de los astrocitos no ha sido suficientemente estudiado.

La **hipótesis** de este trabajo es que la glucosa actúa como un regulador fundamental de la proliferación de los astrocitos y por tanto puede influir en alguna de las diversas vías de señalización implicadas en este proceso.

Puesto que las acciones de la insulina a nivel central son menos conocidas que en los tejidos periféricos, el **objetivo principal** de este trabajo fue estudiar la interdependencia de la glucosa, el GLP-2 y la insulina sobre la proliferación de estas células y las posibles vías de señalización implicadas.

Los **objetivos específicos** fueron estudiar:

- Efecto de la glucosa y del GLP-2 sobre la proliferación de los astrocitos. Regulación de la expresión del receptor de GLP-2.
- Efecto de la glucosa, el GLP-2 y la insulina sobre:
 - ❖ La expresión de marcadores de proliferación y diferenciación y de proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares.
 - ❖ La expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de glúcidos y lípidos.
 - ❖ La expresión de las subunidades de la guanilato ciclasa soluble.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

El GLP-2 de rata, la exendina 4 y la exendina 9-39 fueron obtenidos de Bachem (St. Helens, UK). La insulina recombinante humana ($\text{Arg}^+ \text{Zn}$), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y la cicloheximida fueron obtenidos de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Los factores de crecimiento semejante a insulina-1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) recombinante, derivado de plaquetas (PDGF), epidérmico (EGF), la leptina y el neuropéptido Y (NPY) fueron obtenidos de PreproTech EC Ltd (London, UK). La forskolina fue obtenida de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Heidelberg, Alemania). [Metil- ^3H]-timidina (con una actividad específica media de 60–80 Ci/mmol) fue obtenida de NEN Life Science Products, Inc. (Boston, Massachusetts, USA). El suero bovino fetal (SBF) fue obtenido de Gibco (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), la albúmina de suero bovino (ASB), el Tritón X-100, los diversos medios de cultivo y el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico (HEPES) fueron obtenidos de Sigma (Darmstadt, Alemania). Los frascos y placas de cultivos celulares fueron obtenidos de TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suiza). Los demás productos químicos y materiales usados fueron de grado reactivo o grado de biología molecular. Los materiales específicos empleados para los estudios de expresión génica se mencionarán en el lugar que les corresponda.

2. ANIMALES

Los animales, que fueron generosamente donados por el Profesor Francisco Javier Carricondo Orejana, del Departamento de Inmunología, Oftalmología y Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, procedieron del animalario central de la misma facultad (Centro de Asistencia a la Investigación con N° de registro ES280790000086 en la Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural (perteneciente a la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid). Las condiciones de estabulación de las ratas fueron las recomendadas para el alojamiento de los animales de laboratorio; en este caso, ciclos diarios de luz y oscuridad de 12 horas (concretamente entre las 8 y las 20 horas), en un ambiente con temperatura controlada entre 20 y 24 °C y una humedad relativa de aire de 55±10%. Los animales tuvieron siempre libre acceso a agua y comida, una dieta estándar basada en pellets, conteniendo por cada kilogramo la siguiente composición: 590 g de hidratos de carbono, 30 g de lípidos y 160 g de proteína. Para los experimentos, únicamente se utilizaron neonatos de ratas Wistar, sin hacer distinción por sexos, de hasta 1 día de edad, que fueron rociados con etanol al 70% (v/v) e inmediatamente decapitados siguiendo los Procedimientos de uso de Animales de Laboratorio. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Experimentación Animal, avalado por el cumplimiento de las normas para el cuidado de animales especificadas por la Unión Europea (Real Decreto 542/2016, BOE núm. 297 Ley 32/2007). Para mantener las condiciones de esterilidad durante la extracción del cerebro, la retirada de las meninges, la disección y la disgregación de los hemisferios cerebrales se realizaron dentro de una cabina de flujo horizontal (Telstar, AH-100), con la ayuda de una lupa binocular de hasta 40 aumentos (Leica, MZ 6).

2.1. Preparación de los cultivos de astrocitos de rata y tratamientos

Los cultivos de células astrogliales fueron preparados a partir de los hemisferios cerebrales mediante un procedimiento previamente descrito en nuestro laboratorio¹⁷⁷. El tejido, mediante su paso a través de una malla de nylon (con un tamaño de poro de 135 μm) estéril, fue disociado mecánicamente. Las células fueron sembradas en frascos de cultivo de tejidos de 75 cm^2 a baja densidad y mantenidas en medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12), conteniendo 15 mM de HEPES, en presencia de un 1% (v/v) de penicilina y de estreptomicina (Lonza Biologics, Pontevedra, España) con el fin de minimizar el riesgo de contaminación y suplementado con SBF al 10% (v/v). Durante todo el tiempo de crecimiento, los frascos se conservaron en un incubador (ESCO, CelCulture incubator CCL-170B-8) que mantuvo un ambiente estable con un 5% de CO_2 y una temperatura constante a 37 °C. Los cambios del medio de cultivo se realizaron cada 3-4 días; previamente, los frascos fueron agitados mecánicamente (Renner GMBH, Celloshaker) en el plano horizontal durante 10-40 minutos, dependiendo del tiempo del cultivo primario. Después de entre 21 y 28 días, las células procedentes de estos cultivos primarios se dispersaron mediante tratamiento con tripsina (1X) y EDTA (Gibco, Waltham, Massachusetts, EE.UU) durante 1 ó 2 min, a 37 °C. siempre ayudados de una intensa agitación manual. El seguimiento de la evolución de la tripsinización del cultivo se realizó por la observación del mismo en un microscopio (Leitz Labovet) y cuando se consideró pertinente, la actividad enzimática se inhibió con la adición de SBF. Llegados a este punto, el contenido de todos los frascos, conteniendo los cultivos primarios, fue mezclado y homogeneizado para igualar las condiciones de sembrado posteriores. Los subcultivos se realizaron en diferentes tipos de placas, en función de los análisis que se fueran a realizar con ellas (y se describirán en su lugar) y las células se sembraron siempre a una concentración (cámara de Neubauer) aproximada de

entre $2,3 \times 10^4$ y 3×10^4 células/cm². Cuando los cultivos secundarios alcanzaron entre el 80 y el 90% de confluencia (transcurridos unos 7 a 10 días después de la siembra), se procedió a la realización los diferentes tratamientos que se describen en los subapartados siguientes.

Previamente a los tratamientos, las células se mantuvieron durante 24 ó 48 horas en DMEM-F12 (17,5 mM de glucosa) o en DMEM-5,5 mM de glucosa, libres de suero. En los diversos estudios sobre los efectos de la glucosa, las células se incubaron entre 2 y 4 horas en DMEM, libre de suero y de glucosa. Pasado ese tiempo, los tratamientos también se hicieron en DMEM libre de suero, pero en este caso suplementado con 2 mg/mL de ASB, conteniendo las concentraciones de glucosa indicadas en las respectivas figuras, en ausencia y presencia de GLP-2, insulina o el resto de los estímulos empleados, a las concentraciones y tiempos que también aparecen indicados en las figuras. Para demostrar que el efecto de la concentración de glucosa sobre la proliferación celular no era debido a diferencias de presión osmótica, previamente se realizaron experimentos en los que a los medios conteniendo las menores concentraciones de glucosa (1,4; 2,5; 5, 10, 15 y 20 mM) se les añadió manitol (23,6; 22,5; 20, 15; 10 y 5 mM) hasta igualar la concentración de los medios con la mayor concentración de glucosa utilizada (25 mM). No se observaron diferencias en la densidad celular cuando los astrocitos se incubaron en ausencia y presencia de manitol (resultados no mostrados). En los estudios realizados a una concentración fija de glucosa (17,5 mM), el medio de cultivo empleado en todo momento fue DMEM-F12.

Finalizado el periodo de incubación, los medios se aspiraron cuidadosamente, con la ayuda de una bomba de vacío (Tokyo Rikakikai Co., LTD; modelo A-3S). A continuación, las células se lavaron 3 veces con una disolución salina tamponada con fosfato (PBS), previamente enfriada a 4 °C, sin permitir que las células se deshidrataran

durante el proceso. En caso de no poder realizar los análisis de manera inmediata, las células fueron congeladas y mantenidas a -80 °C hasta la realización de los mismos.

3. TÉCNICAS

3.1. Inmunocitoquímica

La caracterización de los cultivos de astrocitos y, en su caso, la posterior determinación del grado de pureza de los mismos se realizó mediante la detección (por un procedimiento de inmunocitoquímica) de la expresión de un marcador específico de células gliales, la proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

Tras retirar el medio de cultivo y de realizar 3 lavados con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) al 4% (p/v) (disuelto en PBS 0,1 M, pH 7,4) durante 20 minutos y, a continuación, se volvieron a realizar 3 lavados con PBS. Después de la rehidratación y con el fin de inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas, las células fueron incubadas durante unos minutos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Merck). Posteriormente, para disminuir las uniones inespecíficas, las células se incubaron con el suero del animal del que procedía el anticuerpo secundario, en presencia del detergente Tritón-X100 (Sigma), para permeabilizar la membrana plasmática y así permitir el acceso de los diferentes anticuerpos al interior de las células, dado que la GFAP forma parte de un filamento intermedio del citoesqueleto de las células gliales.

La detección de la GFAP se realizó mediante la incubación de las células con el anticuerpo policlonal Anti-GFAP (1:100 (v/v), hecho en conejo, Novus Biologicals), durante 24 horas, a 4 °C y en oscuridad. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS (0,1 M; pH 7,4) y después se incubaron con el anticuerpo secundario biotilado (1:200 (v/v), anti-conejo hecho en burro (MyBioSource) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad. La incubación de los cultivos con el complejo avidina-biotina unido a una peroxidasa y la posterior adición de H₂O₂ y diaminobencidina (DAB, Sigma) mostraron que el 90-95% de las células fueron GFAP positivas (**figura 12**), y en su mayor parte, astrocitos de tipo I.

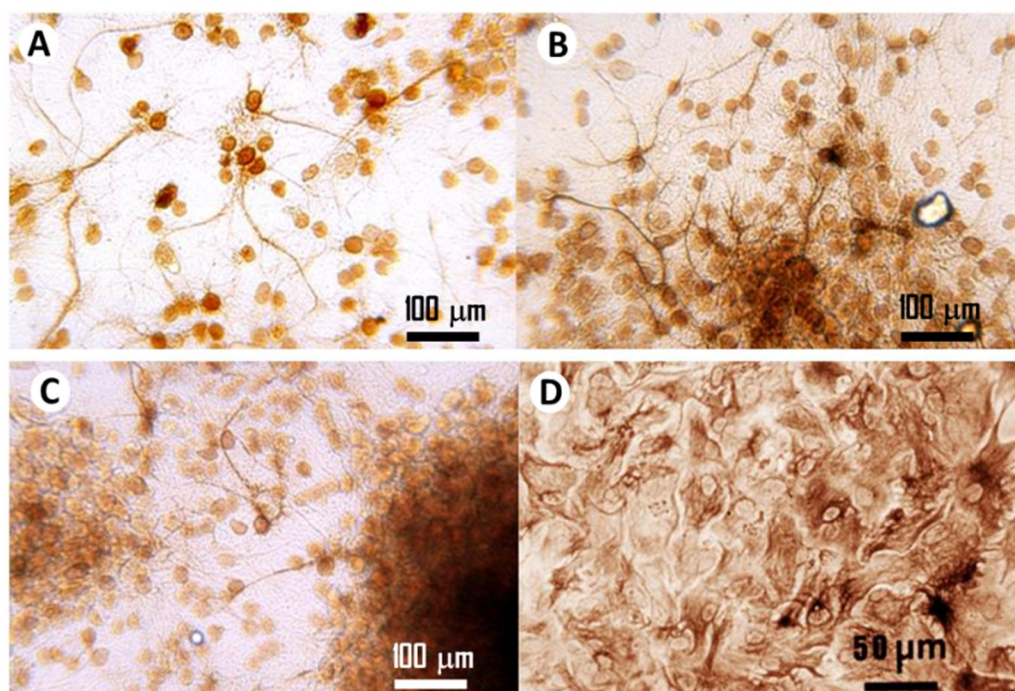


Figura 12. Inmunocitoquímica de células astrogliales GFAP positivas en diferentes etapas de desarrollo

3.2. Tinción con cristal violeta

El número relativo de células (es decir, la densidad celular) se midió mediante un método basado en la tinción con cristal violeta (violeta de genciana) del ADN celular¹⁷⁸. La preparación de las células y los medios de incubación fueron diferentes en función de los estudios realizados. Finalizadas las estimulaciones, 250 ó 500 µL (dependiendo de si la multiplaca usada fue de 24 o de 12 pocillos, repectivamente) de una disolución de cristal violeta (Sigma) a la concentración de 2 mg/mL en etanol al 2% (v/v) fueron añadidos a cada pocillo. Tras mantenerlos a temperatura ambiente durante un tiempo de entre 30 y 60 min, los pocillos fueron lavados varias veces con agua destilada y tras retirar esta, fueron secados al aire. Luego, las células fueron disueltas en dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma) al 1% (p/v) y la densidad óptica fue determinada a 560 nm (DO_{560}) sobre una multiplaca

de 96 pocillos y un lector Varioskan Thermo Electron Corporation, Software ScanIt 2.0.91. Los resultados fueron expresados como absorbancia por pocillo.

3.3. Incorporación de [^3H]-timidina al ADN

La tasa de síntesis de ADN en los astrocitos se valoró según el procedimiento descrito por Velázquez y col.¹⁷³, mediante la cuantificación de la cantidad de radiactividad recuperada en forma precipitable con ácido. Cuando las células sembradas en multiplacas de 12 pocillos alcanzaron la subconfluencia, se prepararon para las estimulaciones como se indica en el apartado anterior, siempre en presencia de DMEM-F12. La [Metil- ^3H]-timidina, a una concentración de 5 $\mu\text{Ci/mL}$, fue añadida 4 horas antes de finalizar los tratamientos. Las reacciones se pararon y las células se procesaron como se ha indicado anteriormente. A continuación, se incubaron primero con 0,5 M hidróxido de sodio (NaOH), durante una hora a temperatura ambiente y luego con ácido tricloroacético al 20% (v/v), durante una hora a 4 °C. El material precipitable con ácido se transfirió a filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron tres veces con ácido tricloroacético al 10% enfriado en hielo y una vez con etanol al 70% (v/v), a -20 °C. Luego, una vez secados a temperatura ambiente, se introdujeron en los viales de centelleo apropiados, a los que se les añadió el correspondiente líquido de centelleo (Scharlau Chemie S.A, Sentmenat, España). La radiactividad contenida en los filtros se midió en un contador de radiaciones beta. Los resultados fueron expresados como desintegraciones por minuto (dpm) de [^3H]-timidina incorporada al ADN por pocillo.

3.4. Medida del AMPc intracelular

En la cuantificación de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular se utilizó un kit comercial (RPN 225, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Cerdanyola, Barcelona, España) para un ensayo inmuno enzimático (EIA) y el protocolo de no

acetilación de las muestras, por lo que el rango útil de la curva de valoración fue entre 12,5 y 3200 fmol por pocillo. Las células, previamente sembradas en multiplacas de 12 pocillos, fueron mantenidas en DMEM-F12 y, cuando alcanzaron la subconfluencia, se procesaron como se ha indicado anteriormente. Los tratamientos también se realizaron en DMEM-F12 libre de suero, suplementado con 2 mg/mL de ASB, en presencia de 10 μ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma), durante 30 minutos. En estos experimentos, la forskolina fue utilizada como control positivo. Finalizadas las estimulaciones, los medios fueron aspirados y las células lavadas con PBS de la forma que ya se indicó en el apartado 3 de Material y Métodos. El AMPc fue extraído con 1 mL de etanol absoluto. Tras su evaporación mediante centrifugación en alto vacío (SPEED VAC concentrator, SVC 200H, Savant), el AMPc fue resuspendido en los tampones apropiados y se procedió a la valoración siguiendo las indicaciones del protocolo proporcionado por el fabricante. Las células, una vez lisadas y resuspendidas en 0,5 mL de NaOH a una concentración 0,5 N, se utilizaron para medir proteína. Los resultados fueron expresados en fmoles de AMPc por mg de proteína en cada pocillo.

3.5. Preparación de ácidos ribonucleicos (ARN) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) del receptor de GLP-2 (GLP-2R) y de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ de la guanilato ciclasa soluble

Los astrocitos, sembrados en placas P-100, fueron mantenidos en los medios que se indican en las leyendas de las figuras correspondientes, dependiendo de si se estudiaba o no el efecto de la glucosa. Asimismo, los diferentes estímulos utilizados, sus concentraciones y los tiempos de tratamiento también se indican en las respectivas figuras. Finalizadas las estimulaciones, las placas se procesaron como se indicó en el apartado 3 de Material y Métodos y, una vez secas, fueron inmediatamente mantenidas a -80 °C hasta su

análisis. El ARN celular total fue aislado mediante un procedimiento modificado del método del tiocianato de guanidinio) y la concentración obtenida se cuantificó en un volumen de 1 μ L de muestra gracias al uso de un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo scientific), además la integridad de las muestras se valoró gracias a un gel de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TAE (Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 8). La primera hebra de ADN complementario (ADNc) fue sintetizada a partir de 1 μ g de ARN total en 20 μ L usando un Kit comercial (RETROscript™, cat num. 1710, Ambion®, Austin, TX, USA). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con la mezcla universal de PCR TaqMan (Applied Biosystems TaqMan Universal Master Mix), usando el ensayo de expresión génica (FAM-labelled TaqMan) siguiendo el protocolo estándar sugerido por la empresa suministradora (Applied Biosystems, Warrington, UK) (**tabla 1**). El análisis de la transcripción inversa a tiempo real para los genes del GLP-2R, y las distintas subunidades de la guanilato ciclasa soluble (α 1, α 2 y β 1) fue realizado comenzando con 75–110 ng del transcrito inverso del ARN total. La PCR se realizó en multiplacas de 96 pocillos usando el Sistema PCR a Tiempo Real 7300 (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados usando el software 7300 System SDS (versión 1.2.3, 2004). Las cantidades relativas de ARN mensajero del GLP-2R (ARNm/GLP-2R) y de las subunidades de la guanilato ciclasa soluble fueron calculadas usando el método comparativo $\Delta\Delta C_T$. El ARN mensajero de la ciclofilina A fue usado como control endógeno de concentración no variable en cada uno de los estudios realizados.

Gen	Casa Comercial	Referencia
GUCY1A3 (α 1)	Thermo Fischer	Rn 00567252_m1
GUCY1B3 (β 1)	Thermo Fischer	Rn 00562775_m1
GUCY1A2 (α 2)	Thermo Fischer	Rn 00576652_m1
GLP-2R	Thermo Fischer	Rn 00573037_m1
Ciclofilina	Thermo Fischer	Rn 00574762_m1

Tabla 1. Relación de iniciadores utilizados para las diferentes RT-PCR

3.6. Identificación de proteínas por inmunotransferencia “Western blotting”

Las células fueron sembradas en placas P-100. Los medios, tratamientos, y tiempos de estimulación fueron los indicados en las figuras respectivas. Finalizados los tratamientos, las células fueron lisadas por la adición de 300 μ L de tampón de lisis a 4 °C e incubación durante 30 min sobre hielo. En determinados casos, las placas fueron sometidas a un pulso de microondas) e inmediatamente después mantenidas a -80 °C hasta su análisis. Llegado el momento, las placas, que durante todo el tiempo estuvieron mantenidas sobre hielo, fueron cuidadosamente raspadas y las células lisadas, trasvasadas a tubos de 1,5 mL.

Tras el homogenizado de las muestras por sonicación, una alícuota se usó para determinar la concentración de proteína con los reactivos de Bradford o de Lowry (Bio-Rad Laboratories S.A., Madrid, España en ambos casos), usando ABS como estándar y al resto se les añadió tampón de carga hasta igualar a la concentración final de proteína a 2 μ g/mL por muestra. Después se guardaron a -80 °C hasta que se procedió a realizar las correspondientes electroforesis. En los estudios sobre la expresión de las subunidades de la guanilato ciclasa, una vez retirada la alícuota para medir proteína, las muestras se separaron en dos nuevas alícuotas: a una de ellas (denominada fracción total) se le añadió tampón de carga hasta una concentración final de proteína de 2 μ g/ μ L y se guardó a -80 °C. La otra alícuota fue centrifugada a 100000 g (Ultracentrífuga Beckman, optima L-100 XP, rotor Beckman 50.3 Ti) durante 1 hora a 4 °C. Al sobrenadante (denominada fracción citosólica), una vez tomada una alícuota para medir proteína, se le añadió tampón de carga hasta igualar la concentración de proteína, tras lo cual, también se guardó a -80 °C hasta que se procedió a realizar las correspondientes electroforesis. Entre 20 y 40 microgramos de muestra fueron calentados a 95 °C durante 5 min, en presencia de una concentración final de 10% de β -mercaptoetanol (Merck) con el fin de asegurar la desnaturalización de

las proteínas. Después, las muestras y un marcador de peso molecular (Precision Plus proteinTM Standards All Blue, Bio-Rad Laboratories S.A., Madrid, España) fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bio-Rad Laboratories S.A.), con una concentración de poliacrilamida variable entre el 6 y el 14% dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar, conteniendo además un 1% de SDS. La electroforesis se desarrolló a 70 V en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,01%). Acto seguido las proteínas fueron electrotransferidas, durante toda una noche a 10 mA por membrana y en frío, a una membrana de difluoruro de polivinilideno de 0,45 µm (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), activada según las indicaciones del fabricante. El medio utilizado para la electrotransferencia consistió en un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, metanol al 20% y SDS al 0,01%). Después de cada transferencia, y con el fin de confirmar la correcta realización de esta, tanto los geles como las membranas fueron rutinariamente teñidos con azul coomasie y rojo ponceau (Merck) o fast Green (Sigma), respectivamente, según las indicaciones del fabricante. Para evitar uniones inespecíficas, tanto de los anticuerpos primarios como de los secundarios, las membranas transferidas fueron bloqueadas con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) disuelta en un tampón TRIS/salino, conteniendo el 0,1% de Tween-20 (TBST) durante 1 ó 2 horas, a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios (**tabla 2**) diluidos en TBST con leche a la misma concentración que la utilizada en el bloqueo hasta la concentración requerida, a 4 °C durante la noche. Después de lavarlas 3 ó 4 veces con TBST, durante 10 min, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios unidos a la peroxidasa de rábano (HRP) (**tabla 2**), diluidos en TBST con un 5% (v/v) de leche en polvo desnatada. La detección de la quimioluminiscencia se realizó mediante un sistema ECL de Western blotting (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Cerdanyola,

Barcelona, España; o Millipore Co, Darmstadt, Alemania), con películas de rayos-X (X-Ray Film Medical Plus, Sakura Kinica Minolta) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y reveladas en un equipo de revelado Agfa Curix 60. Posteriormente, las autorradiografías fueron analizadas por densitometría (Model GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) y cuantificadas (Quantity One software, Bio-Rad). Con el fin de confirmar que la concentración de proteína cargada de cada muestra fuera la misma, se utilizaron sistemáticamente, a modo de control de carga, anticuerpos contra ciclofilina A o β -actina.

Anticuerpo	Peso molecular (kDa)	Huésped	Casa comercial	Dilución
anti Ac.CoA Carboxilasa	257	conejo	Millipore	1/500
anti Ac.CoA Carboxilasa (Ser79)	257	Conejo	Millipore	1/500
anti AKT	60	conejo	Cell Signaling	1/5000
anti p-AKT (Ser473)	60	ratón	Millipore	1/5000
anti AMPK α	62	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti p-AMPK α (Thr172)	62	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti β -actina	40	ratón	Sigma Aldrich	1/5000
anti-cFos	55	ratón	GeneTex	1/500
anti ciclofilina	20	conejo	Calbiochem	1/5000
anti conejo HRP		cabra	Millipore	1/5000
anti CREB-1	43	ratón	Santa cruz Biotechnology	1/1000
anti MAP Kinasa ERK1/ERK2	42/43	conejo	Calbiochem	1/5000
anti p-ERK (Ser660)	42/44	conejo	MBL International Corporation	1/5000
anti-GAPDH	36	ratón	GeneTex	1/100
anti GCK (H-88)	50	conejo	Santa cruz Biotechnology	1/5000
GCS- α -1	72	conejo	Sigma-Aldrich	1/1000
GCS- β -1	65	conejo	Santa cruz Biotechnology	1/2000
GCS- α -2	82	cabra	Santa cruz Biotechnology	1/2000

Continuacion de la tabla

anti GLP-2R	72	cabra	Alpha Diagnostic	1/1000
anti GLUT-1	45-60	conejo	Santa Cruz	1/1000
anti GLUT-2	62	conejo	Calbiochem	1/1000
anti GSK3 α/β	51/46	conejo	Millipore	1/5000
anti GSK3 β	46	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti p-GSK3 α/β (Ser 21/9)	51 α /46 β	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti IGF-1	95	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti IR	95	ratón	Millipore	1/1000
anti IRS-1	180	conejo	Cell Signaling	1/5000
anti p-IRS-1 (Ser 636/639)	180	conejo	Cell Signaling	1/5000
anti p-IRS-1 (Tyr612)	180	conejo	Sigma Aldrich	1/5000
anti mTor	289	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti p-mTor (Ser 2448)	289	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti PASK	170	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti PCG1 α	113/38	ratón	Millipore	1/1000
anti Pi3K (p85)	85	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti p-Pi3K p85(Tyr458)/p55(Tyr199)	60/85	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti P70s6k	70/85	conejo	Cell Signaling	1/5000
anti p-P70s6k (Thr389)	70/85	conejo	Cell Signaling	1/1000
anti PTEN	54	conejo	Millipore	1/500
anti ratón HRP		cabra	Bethyl Laboratories	1/5000
anti p-ribosomal protein S6(Ser235)	30	conejo	Millipore	1/1000
anti SREBP1	125/68	conejo	Santa Cruz	1/1000

Tabla 2. Relación de los anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunotransferencia, el animal huésped y la concentración requerida

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de 2 ó 3 experimentos independientes realizados por duplicado, triplicado, cuádruplado o sextuplicado, según los casos. Para las comparaciones estadísticas entre dos variables independientes que presentaron una distribución normal con varianzas iguales, se utilizó

la prueba t de Student para datos independientes (SPSS; IBM, versión 25). Diferencias con $P < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas (*), con $P < 0,01$.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA GLUCOSA Y DEL GLP-2 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LOS ASTROCITOS. ESPECIFICIDAD DE LAS ACCIONES BIOLÓGICAS DEL GLP-2

Como se muestra en la **figura 13**, la glucosa produjo un incremento dosis-dependiente, y posiblemente bifásico, de la densidad celular que fue máxima en presencia de 25 mM y un 66% mayor que la obtenida con 1,4 mM de glucosa. La adición de GLP-2 produjo un efecto similar al obtenido en su ausencia, salvo en presencia de 15 y 20 mM de glucosa, en donde el GLP-2 produjo un incremento significativo adicional del número de células.

Para descartar la posibilidad de que los efectos biológicos del GLP-2 pudieran ser mediados a través del GLP-1R, se midieron los efectos de ambos péptidos, y también de la Exendina-4 (agonista del GLP-1R), sobre la proliferación celular y la producción de AMPc. El GLP-2 incrementó muy significativamente la incorporación de [³H]timidina al ADN (**figura 16**), la densidad celular (**figura 15A**) y la concentración intracelular de AMPc (**figura 16A**). Por el contrario, los efectos del GLP-1 y de la Exd-4 fueron nulos o significativamente inferiores a los obtenidos por el GLP-2. Además, la producción de AMPc inducida por GLP-1+GLP-2 fue aproximadamente la media de la obtenida por cada uno de ellos (**figura 16A**). Resulta especialmente importante destacar que los efectos del GLP-2 sobre la densidad celular (**figura 15B**) y la producción de AMPc (**figura 16B**) fueron completamente abolidos en presencia de Exd (9-39), un reconocido antagonista del GLP-1R.

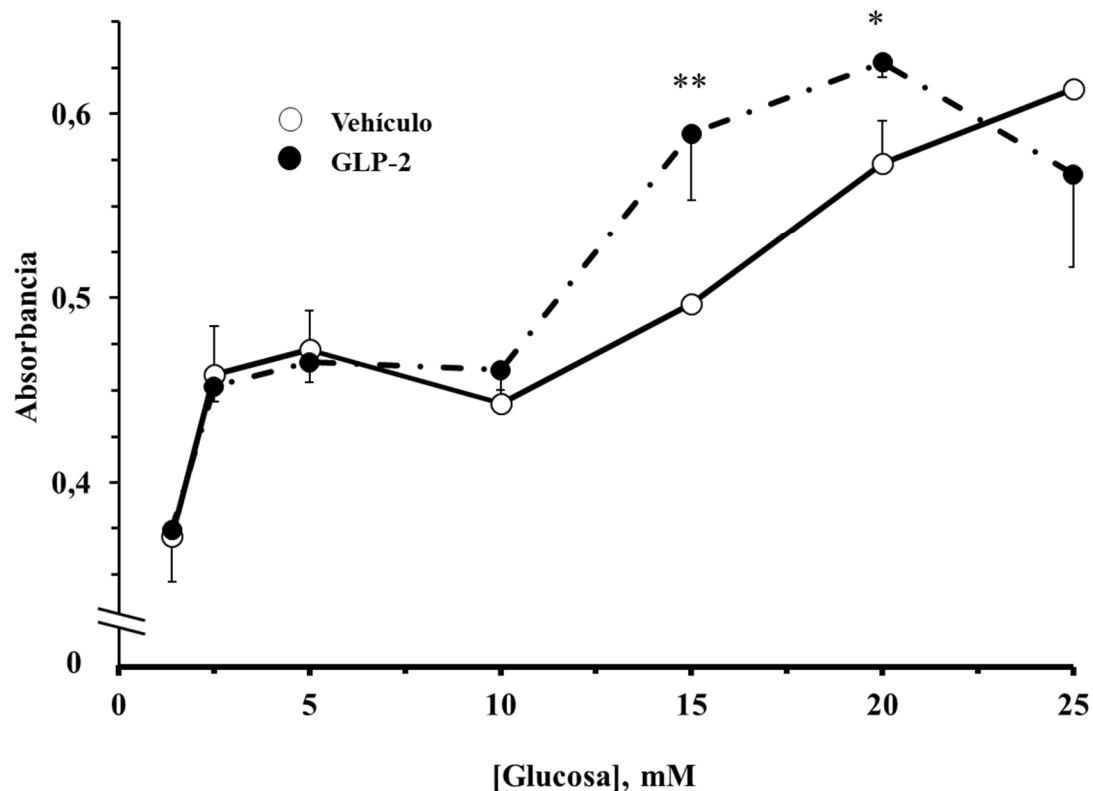


Figura 13. Efecto de la glucosa en ausencia y presencia de GLP-2 sobre la densidad celular de astrocitos de rata en cultivo. Los astrocitos fueron incubados en DMEM-F12 libre de SBF, conteniendo las concentraciones de glucosa indicadas, en ausencia y presencia de GLP-2 (100 nM), durante 48 horas. La densidad celular se midió por tinción de los núcleos con cristal violeta como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado, medida como la absorbancia a 560 nm en cada pocillo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con GLP-2.

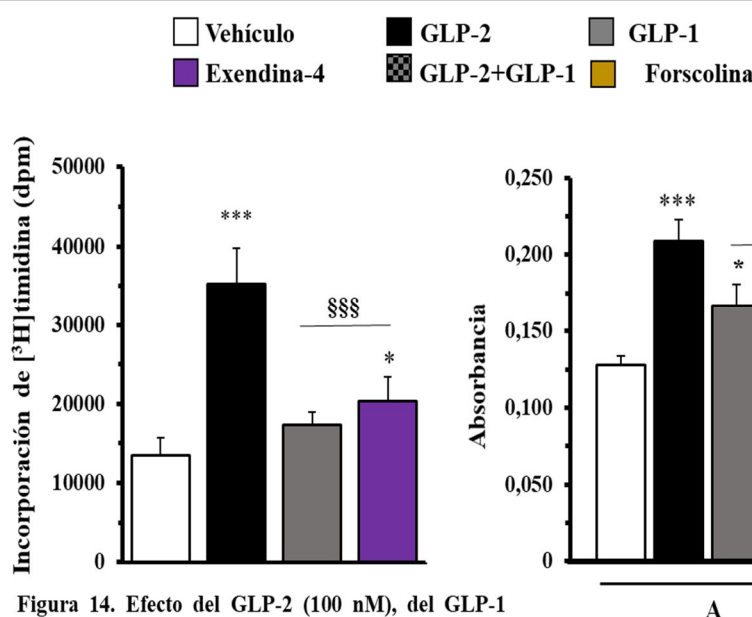


Figura 14. Efecto del GLP-2 (100 nM), del GLP-1 (100 nM) y de la exendina-4 (Exd-4, 50 nM) sobre la incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina al ADN en astrocitos de rata en cultivo. Los astrocitos fueron incubados en DMEM-F12 libre de SBF en ausencia y presencia de los tratamientos indicados durante 24 horas, las últimas 4h también en presencia de $[^3\text{H}]$ -timidina a la concentración final de 5 Ci/mL. La radiactividad fue valorada como se indica en "Material y Métodos". Los resultados representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por sextuplicado, medida como desintegraciones por pocillo. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las células control. §§§ $p < 0.001$, al comparar las células tratadas con GLP-2 con las tratadas con GLP-1 o Exd-4.

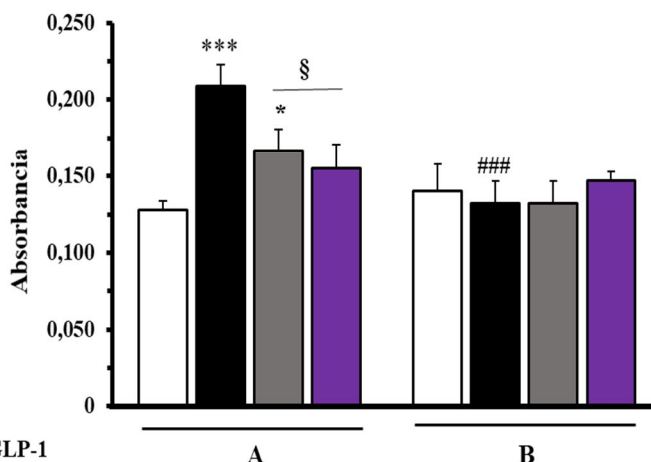


Figura 15. Efecto del GLP-2 (100 nM), del GLP-1 (100 nM) y de la exendina-4 (50 nM) sobre la densidad celular de astrocitos de rata en cultivo, en ausencia (A) y presencia (B) de exendina (9-39), 500 nM. Los astrocitos fueron incubados en DMEM-F12 libre de SBF en ausencia y presencia de los tratamientos indicados durante 24 horas. La densidad celular se midió por tinción de los núcleos con cristal violeta como se indica en "Material y Métodos". Los resultados representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado, medida como la absorbancia a 560 nm en cada pocillo. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las células control. § $p < 0.05$, al comparar las células tratadas con GLP-2 con las tratadas con GLP-1 o Exd-4. ### $p < 0.001$, al comparar las células tratadas con GLP-2 en ausencia y presencia de Exd (9-39).

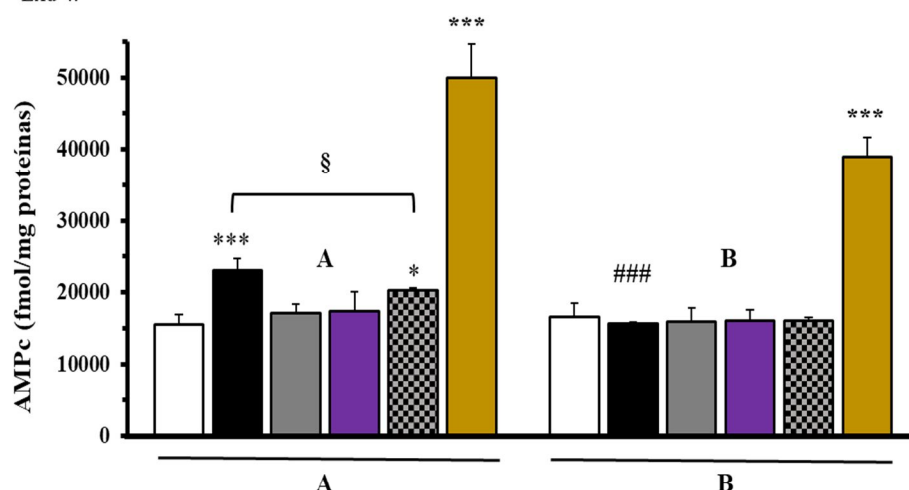


Figura 16. Efecto del GLP-2 (10 nM), del GLP-1 (10 nM), de la exendina-4 (5 nM), del GLP-1 (10 nM) + GLP-2 (10 nM) y de la forskolina (20 y 5 μM) sobre la producción de AMP cíclico en astrocitos de rata en cultivo, en ausencia (A) y presencia (B) de exendina (9-39), 100 nM. Los astrocitos fueron incubados en DMEM-F12 libre de SBF en ausencia y presencia de los tratamientos indicados durante 30 minutos. El AMPc intracelular se valoró mediante un ensayo inmunoenzimático comercial como se indica en "Material y Métodos". Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (Test t de Student para datos independientes), al comparar las células tratadas con las células control. § $p < 0.05$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con GLP-2 en ausencia y presencia de GLP-1. ### $p < 0.001$, al comparar las células tratadas con GLP-2 en ausencia y presencia de Exd (9-39). La forskolina se usó como control positivo.

2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-2

Dado que los resultados expuestos en esta tesis han sido realizados en cultivos celulares que tras aproximarse o alcanzar la confluencia fueron mantenidos en medio de cultivo exento de SBF por periodos de hasta 48 horas, un objetivo fue determinar el nivel de expresión del ARN mensajero del GLP-2R (ARNm/GLP-2R) al inicio de los diversos tratamientos. Como se observa en la **figura 17**, la expresión fue máxima en la primera valoración (**figura 17a**, $\approx 50\%$ de confluencia al séptimo día de subcultivo) y disminuyó linealmente con el aumento del número de células, siendo aproximadamente un 50% menor cuando las células alcanzaron la subconfluencia (**figura 17d**). La retirada del SBF del medio de cultivo durante 48 h (**figura 17e**) produjo un descenso adicional de la expresión del ARNm/GLP-2R, hasta alcanzar un 25% del valor de referencia.

Los estudios sobre la regulación de la expresión del ARNm/GLP-2R se iniciaron con la valoración de los efectos de la concentración de glucosa en ausencia y presencia de GLP-2. Como se observa en la **figura 18A**, a las 4 horas de incubación, dicha expresión fue incrementada de forma dosis-dependiente hasta alcanzar un máximo en presencia de 17,5 mM de glucosa, que fue 2,3 veces superior a la obtenida con la concentración usada como referencia (1,4 mM). La presencia de GLP-2 produjo un incremento adicional de la expresión (13%-50%) del ARNm en las células incubadas con medios conteniendo hasta 12,5 mM de glucosa, disminuyendo luego linealmente hasta igualarse los valores obtenidos en ausencia y presencia de GLP-2 en las células incubadas con 25 mM de glucosa. No obstante, cabe destacar que en los astrocitos mantenidos en medio con 17,5 mM de glucosa, la expresión fue un 15% inferior en presencia de GLP-2 que en su ausencia.

Para comprobar si esta regulación negativa de la expresión del ARNm/GLP-2R era debida al tiempo de incubación, se realizaron experimentos en los que los astrocitos, mantenidos en un medio conteniendo 17,5 mM de glucosa, fueron tratados con GLP-2

durante 30 min y 18 horas. La **figura 18B** muestra que, a tiempos cortos, el GLP-2 produjo un 60% de incremento de la expresión del ARNm/GLP-2R. Sin embargo, a tiempos largos (**figura 19**), y a pesar de que las células fueron incubadas con diferentes dosis (entre 10^{-10} y 10^{-6} M) de GLP-2, solo se obtuvieron efectos significativos (24% de disminución) sobre la expresión en presencia de 10 nM del péptido.

Además de por su propio ligando, el efecto del IGF-1 sobre la regulación de la expresión del ARNm/GLP-2R también fue estudiado, presentando en relación al tiempo de incubación un comportamiento multifásico y cuyos valores fueron significativamente inferiores a los de los controles, salvo a las 3 horas de incubación, que fue un 25% mayor (**figura 20A**). A tiempos largos de incubación (18 horas, **figura 20B**), no se observaron diferencias significativas en la expresión del ARNm/GLP-2R entre las células incubadas en ausencia y presencia de IGF-1, ni tampoco cuando los astrocitos fueron incubados con IGF-1+GLP-2. Asimismo, en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (17,5 mM), los efectos a corto (30 minutos, **figura 21A**) y largo plazo (18 horas, **figura 21B**) de la insulina y diversos factores de crecimiento también fueron estudiados. Como puede observarse, la insulina ni la insulina+GLP-2 modificaron la expresión del ARNm/GLP-2R a ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, el PDGF sí produjo efectos significativos, aunque de signo contrario dependiendo del tiempo de incubación: 45% de incremento a los 30 minutos y 40% de disminución a las 18 horas. La adición de PDGF+GLP-2 solo tuvo efectos significativos en las incubaciones a corto plazo, duplicando la expresión obtenida en las células control y elevando en un 50% la de las células incubadas con PDGF. A los 30 minutos de incubación, el IGF-2 produjo un 40% de incremento y el NGF un 25% de disminución de la expresión. La adición de GLP-2 no afectó a los astrocitos incubados con IGF-2, pero duplicó la expresión obtenida por el NGF (**figura 21A**). El efecto del EGF, en ausencia y presencia de GLP-2, sobre la expresión del ARNm/GLP-2R fue valorado a las 18 horas de incubación y

como puede observarse, no hubo diferencias significativas entre las dos situaciones estudiadas y las células control (**figura 21B**).

El efecto de la leptina y del NPY sobre la expresión del ARNm/GLP-2R fue estudiado a las 4 horas de incubación, en presencia de una muy baja concentración de glucosa (1,4 mM) y como se muestra en la **figura 22**, ambos péptidos causaron una disminución significativa (45% y 70%, respectivamente) de la expresión.

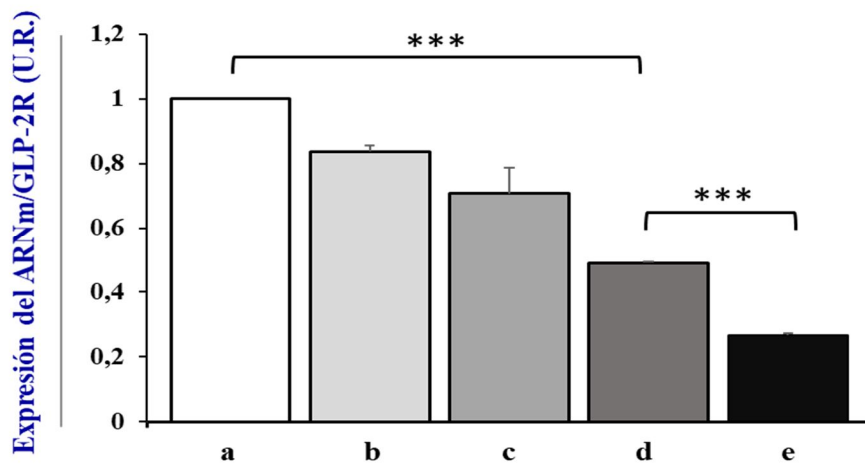


Figura 17. Relación entre el grado de confluencia (días de subcultivo) de astrocitos de rata y la expresión del ARNm del receptor de GLP-2 (GLP-2R) en presencia (a-d) y ausencia (e) de SBF. Los astrocitos fueron sembrados en placas P-100 y crecidos durante 7 (a, \approx 50% confluencia), 10 (b, 65%), 14 (c, 80%), y 17 (d, 95%) días en presencia de DMEM/F-12 suplementado con SBF al 10%, o 19 días (e, las últimas 48 horas en ausencia de SBF). Finalizado el periodo de incubación, el ARN total de cada placa fue extraído como se indica en Material y Métodos y la expresión del ARNm del GLP-2R se valoró por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado. *** $p < 0,001$ (Test t de Student para parejas datos independientes). U.R., unidades relativas.

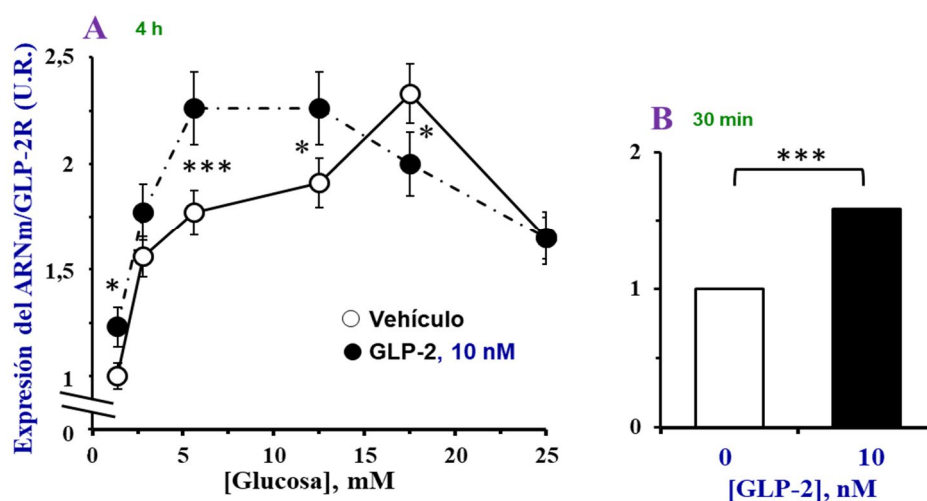


Figura 18. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en ausencia y presencia de GLP-2 sobre la expresión del ARNm del GLP-2R en astrocitos de rata en cultivo. Los astrocitos fueron incubados en DMEN, libre de SBF, suplementado con ASB, conteniendo distintas concentraciones de glucosa en ausencia y presencia de GLP-2, durante 4 horas (A) y en DMEM-F12 (17,5 mM glucosa), libre de SBF, suplementado con ASB, durante 30 minutos (B). El análisis del ARNm/GLP-2R fue realizado por RT-PCR cuantitativa a tiempo real como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con GLP-2. U.R., unidades relativas.

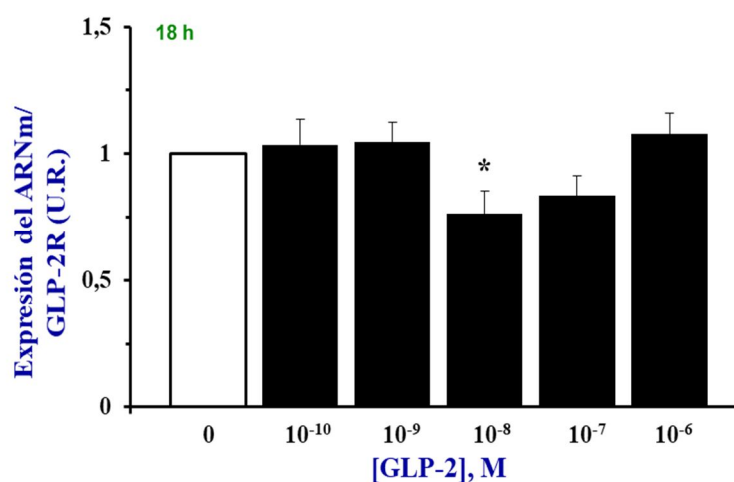


Figura 19. Efecto dosis-dependiente del GLP-2 sobre la expresión del ARNm del GLP-2R en astrocitos de rata en cultivo. Los astrocitos fueron incubados durante 18 horas en medio DMEM-F12 libre de SBF en presencia de las concentraciones GLP-2 indicadas. El análisis del ARNm-GLP-2R fue realizado por RT-PCR cuantitativa a tiempo real como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.05$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con GLP-2 con las células no tratadas control. U.R., unidades relativas.

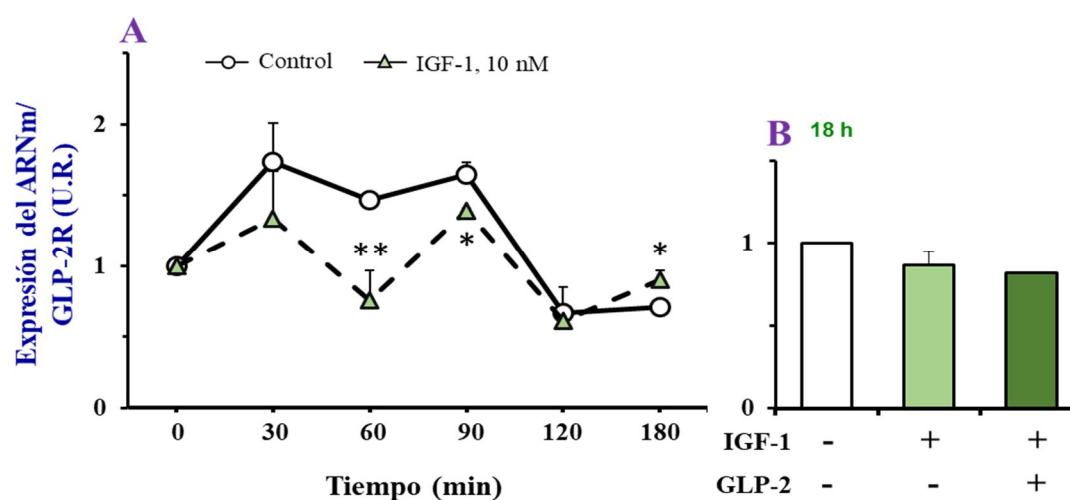


Figura 20. Curso temporal del efecto del IGF-1 (A) y efecto del IGF-1 en ausencia y presencia de GLP-2 (B) sobre la expresión del ARNm del GLP-2R en astrocitos de rata en cultivo. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEM-F12, libre de SBF, en ausencia y presencia de IGF-1 durante los tiempos indicados en la figura (A) o en ausencia y presencia de IGF-1 (10^{-8} M) e IGF-1 + GLP-2 (5×10^{-7} M) durante 18 horas (B). El análisis del ARNm/GLP-2R fue realizado por RT-PCR cuantitativa a tiempo real como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con IGF-1. U.R., unidades relativas.

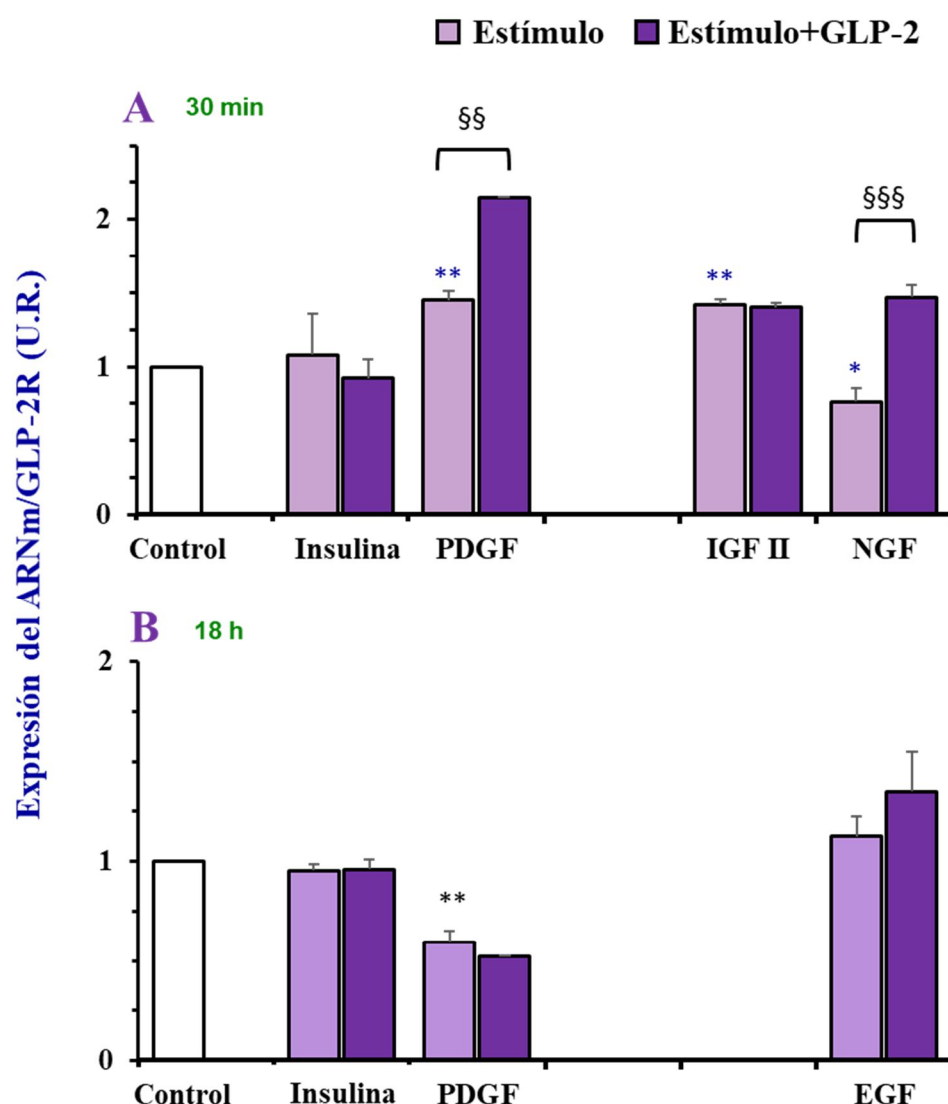


Figura 21. Efecto de A) insulina, PDGF, IGF-II, y NGF y B) Insulina, PDGF y EGF sobre la expresión del ARNm del GLP-2R en astrocitos de rata en cultivo a los 30 minutos (A) y 18 horas de incubación (B). Los astrocitos fueron incubados en medio DMEM-F12, libre de SBF, con los diversos estímulos (Insulina, 10^{-7} M; EGF, 10^{-8} M; IGF-II, 10^{-8} M; PDGF, 10^{-9} M; NGF, 10^{-9} M) en ausencia y presencia de GLP-2 (5×10^{-7} M). El análisis del ARNm/GLP-2R fue realizado por RT-PCR cuantitativa a tiempo real como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con los diferentes estímulos con las células control. §§ $P < 0.01$; §§§ $P < 0.001$, al comparar las células tratadas con los diferentes estímulos con las que contienen GLP-2 añadido. U.R., unidades relativas.

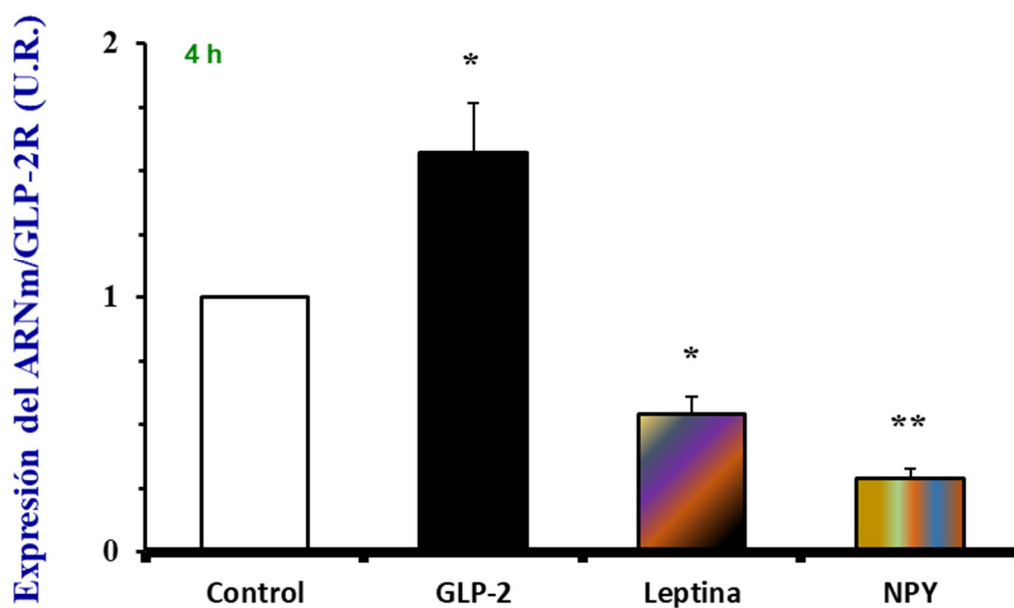


Figura 22. Efecto del GLP-2, la leptina y del Neuropéptido Y (NPY) sobre la expresión del ARNm/GLP-2R en astrocitos de rata en cultivo.

Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, conteniendo 1,4 mM de glucosa, en presencia de GLP-2 (10^{-7} M), leptina (10^{-8} M) o NPY (10^{-7} M) durante 4 horas. El análisis del ARNm/GLP-2R fue realizado por RT-PCR cuantitativa a tiempo real como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con los diferentes estímulos con las células control. U.R., unidades relativas.

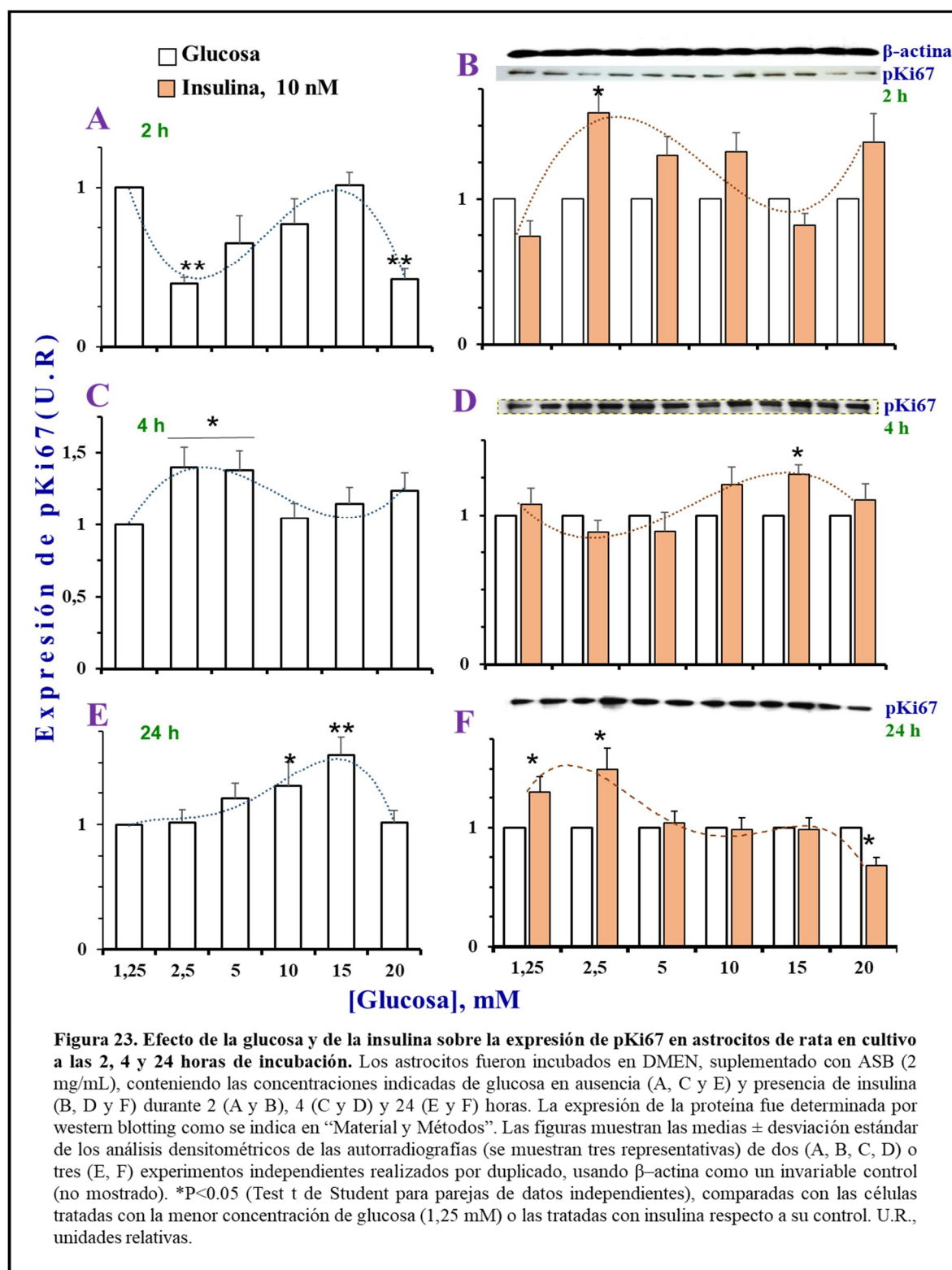
3. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

Puesto que tanto la densidad celular como la expresión del ARNm/GLP-2R fueron dosis-dependientemente incrementados por glucosa, el efecto de este azúcar sobre la expresión de determinados marcadores de proliferación, tales como pKi67, PCNA y c-FOS, fueron estudiados. Igualmente, dado que la insulina ha mostrado no modificar la expresión del ARNm/GLP-2R, los efectos de esta hormona también han sido estudiados y, en ciertos casos, comparados con los producidos por el GLP-2.

La expresión de pKi67 presentó un comportamiento probablemente bifásico dependiente de la concentración de glucosa a las 2, 4 y 24 horas de incubación (**figuras 23A, C y E**), alcanzándose los máximos valores a las concentraciones 1,25; 2,5-5 y 15 mM, respectivamente, y los mínimos, a las concentraciones inmediatamente superiores ensayadas. En general, la presencia de insulina también produjo efectos bifásicos sobre la expresión de pKi67, pero revirtiendo los valores obtenidos en su ausencia (**figuras 23B, D y F**).

La expresión de PCNA adoptó un comportamiento bifásico dependiente de glucosa a las 2 horas de incubación, produciéndose los máximos efectos a las concentraciones 5 y 20 mM (**figura 24A**) y la insulina incrementó dicha expresión, salvo en presencia de la mayor concentración de glucosa (**figura 24B**). A las 4 horas de incubación (**figura 24C**), la mínima expresión se obtuvo en las células incubadas con 5 mM de glucosa y la insulina solo superó la expresión de sus respectivos controles a partir de esta concentración de glucosa (**figura 24D**). El efecto de la glucosa sobre la expresión de PCNA fue significativamente dependiente de la concentración (14 veces mayor con 20 mM que con 1,25 mM), a las 24 horas de incubación (**figura 24E**). La insulina incrementó la expresión de PCNA solo en presencia de 15 mM de glucosa (**figura 24F**).

El efecto de la insulina y del GLP-2 sobre la expresión temprana de PCNA (hasta 60 min de incubación) fue determinada en presencia de dos concentraciones extremas de glucosa (0,5 y 25 mM) y como se muestra en la **figura 25**, no se observaron diferencias significativas entre ningunas de las situaciones estudiadas. Sin embargo, en estas mismas condiciones experimentales, la expresión temprana de c-FOS, en ausencia y presencia de insulina o GLP-2, solo mostró diferencias significativas en las células mantenidas en 0,5 mM de glucosa (**figura 26**). Tampoco se observaron diferencias en la expresión de c-FOS cuando los astrocitos fueron incubados durante 24 horas con diferentes concentraciones de glucosa, en ausencia o presencia de insulina o GLP-2 (**figura 27**). Sorprendentemente, la expresión de GFAP a las 24 horas de incubación fue un 25-40% menor en las células mantenidas con 5,5-25 mM de glucosa que con 2,5 mM, sin que la adición de insulina o GLP-2 produjera efectos significativos (**figura 28**).



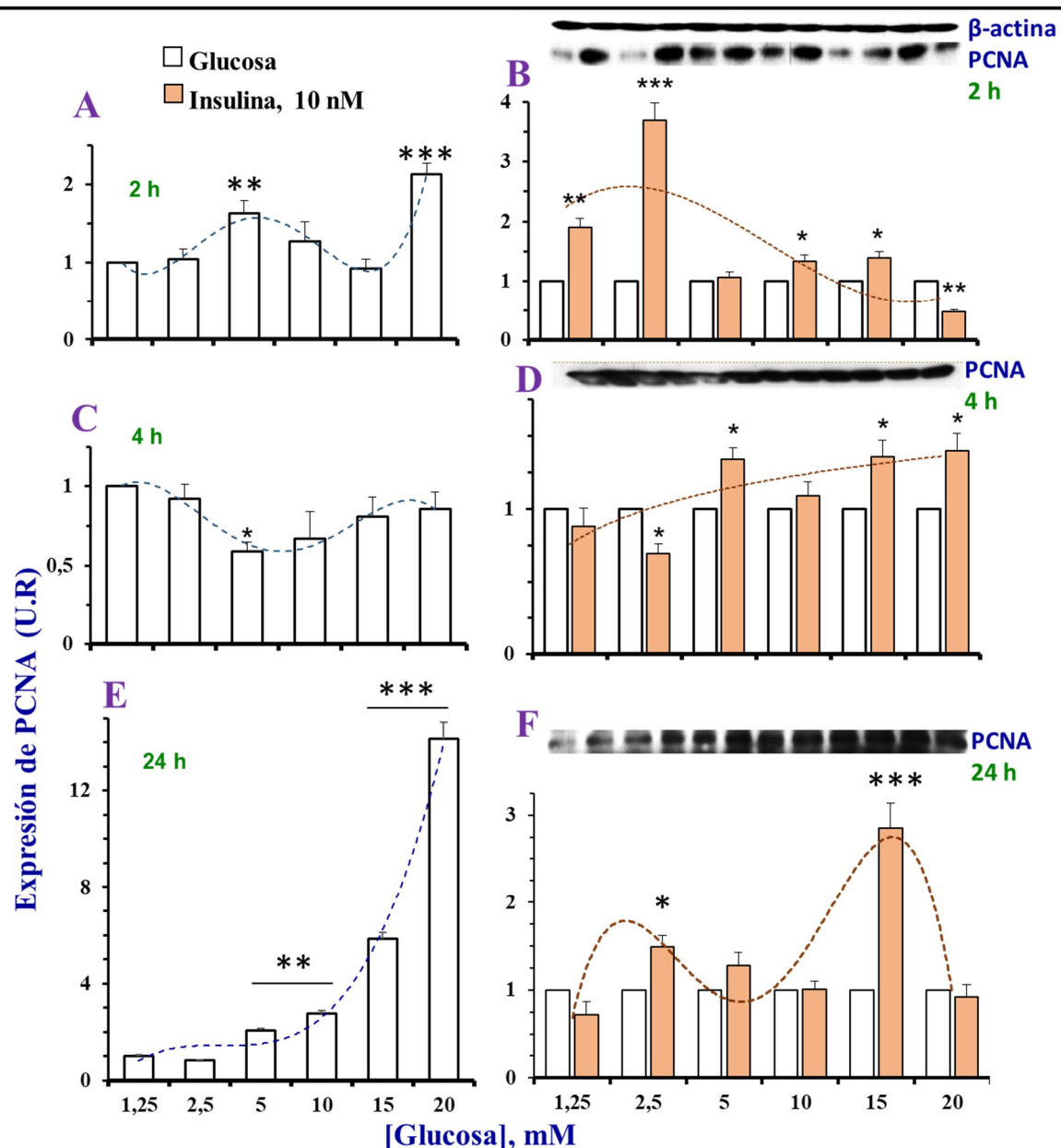
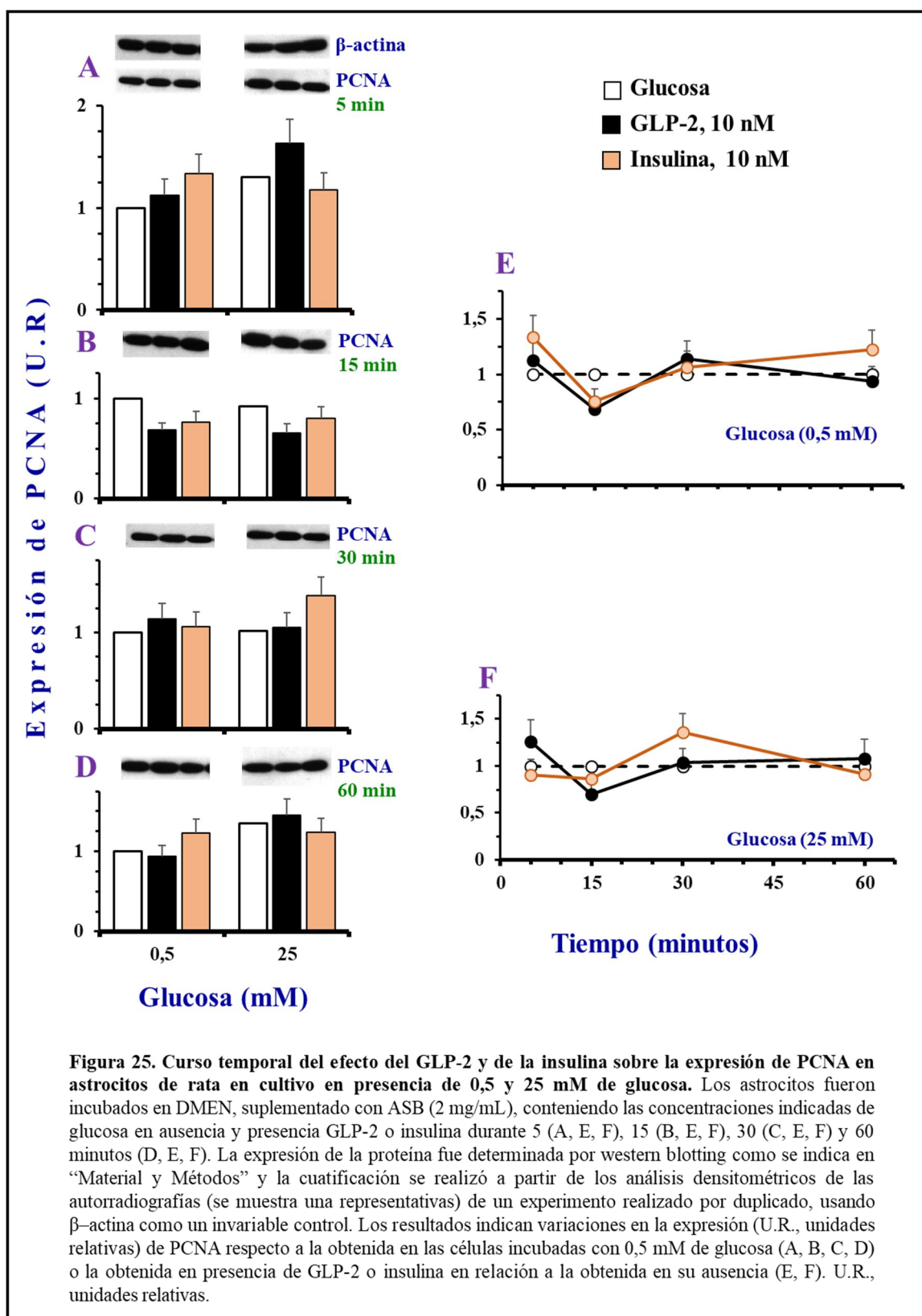
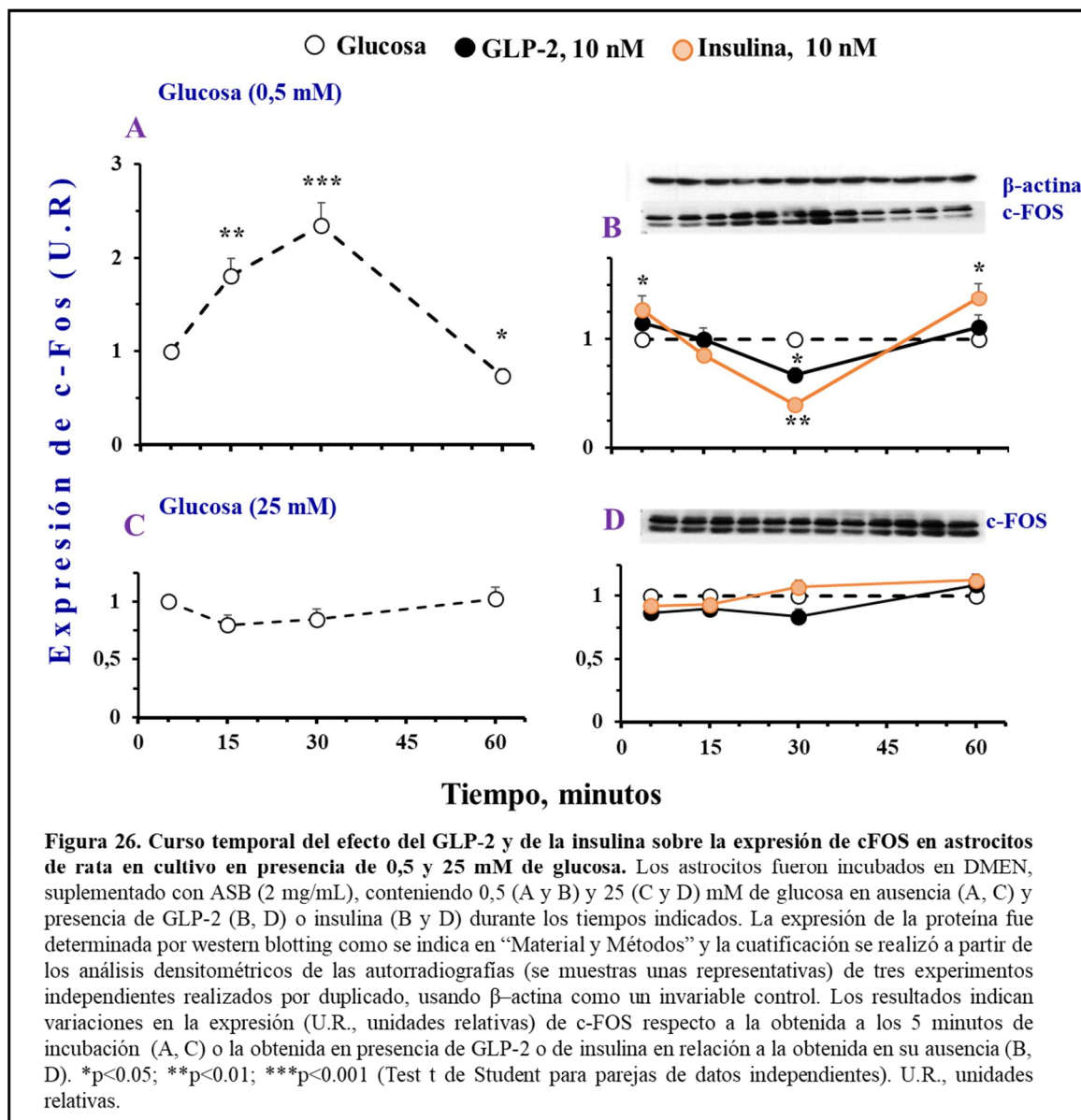
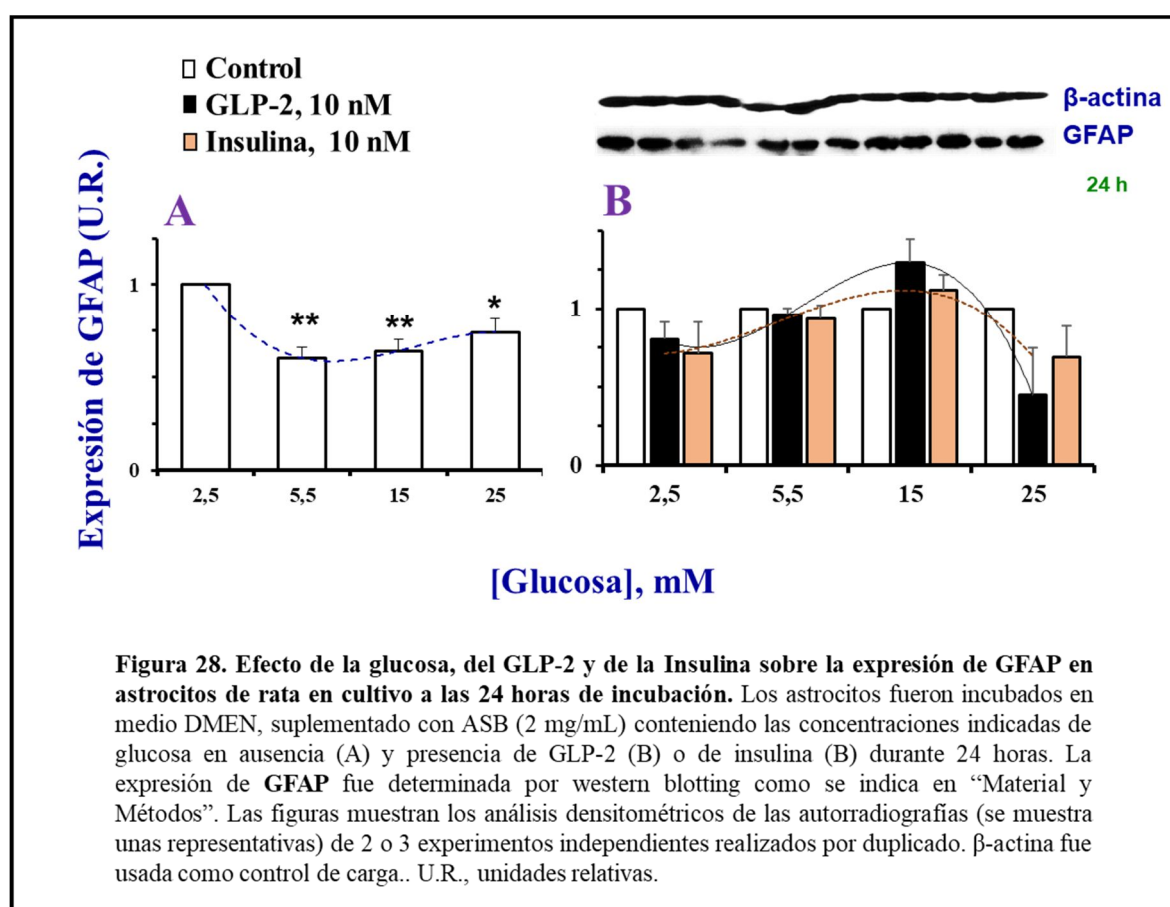
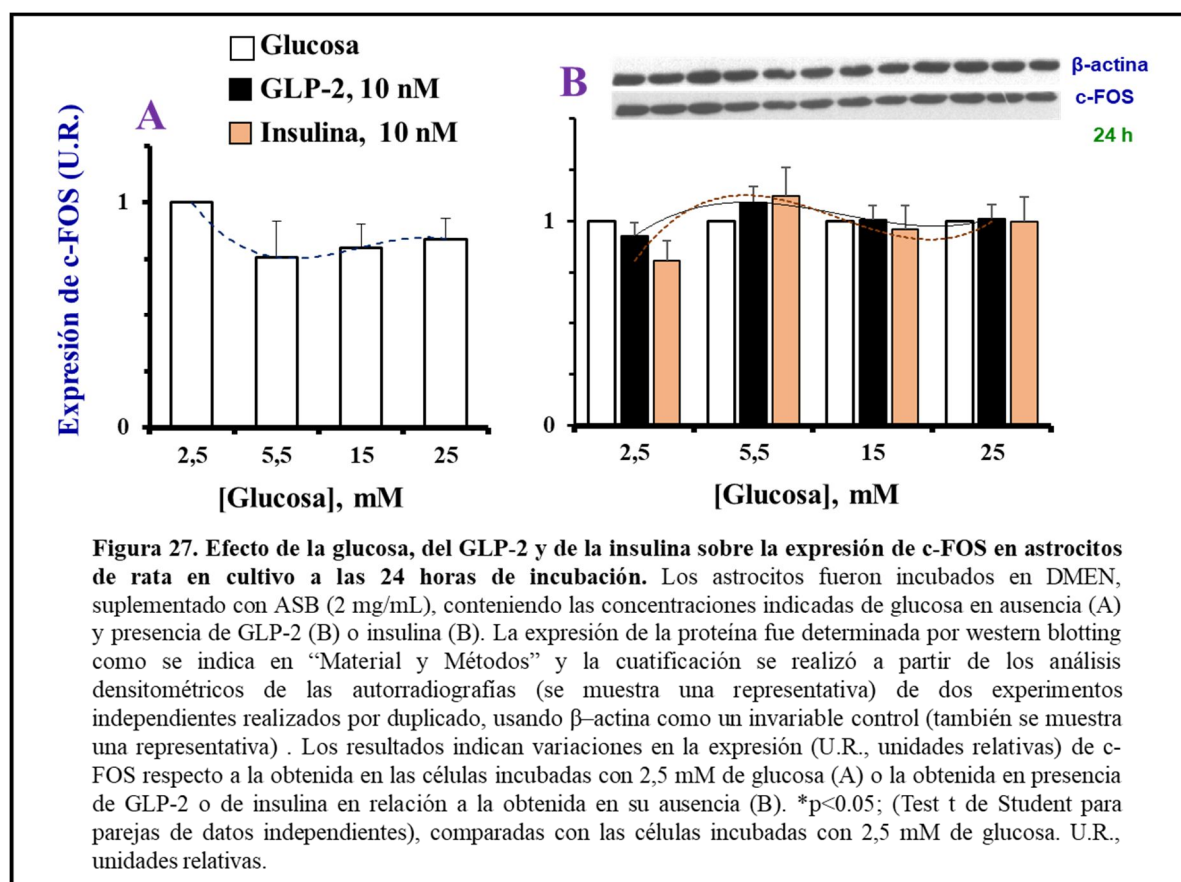


Figura 24. Efecto de la glucosa, de la insulina y del GLP-2 sobre la expresión de PCNA en astrocitos de rata en cultivo a las 2, 4 y 24 horas de incubación. Los astrocitos fueron incubados en DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa en ausencia (A, C, E) y presencia de insulina (B, D, F) o de GLP-2 (F) durante 2 (A, B), 4 (C, D) y 24 (E, F) horas. La expresión de la proteína fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestran tres representativas) de dos o tres experimentos realizados por duplicado, usando β -actina como un invariable control. Los resultados indican variaciones en la expresión (U.R., unidades relativas) de PCNA respecto a la obtenida en las células incubadas con 1,25 mM de glucosa (A, C, E) o la obtenida en presencia de insulina (B, D, F) o GLP-2 (F) en relación a la obtenida en su ausencia (B, D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes). U.R., unidades relativas.







4. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE GLÚCIDOS Y LÍPIDOS

Debido a los efectos de la glucosa, el GLP-2 y la insulina sobre la proliferación de los astrocitos en cultivo, hemos estudiado su papel en la homeostasis energética general mediante la cuantificación de la expresión de ciertas proteínas implicadas en el metabolismo de glúcidos y lípidos. Así, la expresión de SREBP-1c en las células incubadas con 5,5 y 15 mM de glucosa durante 24 horas fue significativamente mayor que en las células control (2,5 mM), mientras que fue menor en las incubadas con 25 mM (**figura 29A**). El GLP-2 disminuyó la expresión del factor de transcripción de las células incubadas con 25 mM de glucosa, y la insulina, por su parte, aumentó la expresión de las células incubadas con 2,5 y 5,5 mM, la disminuyó en las incubadas con 15 mM y no hubo diferencia con las incubadas con 25 mM de glucosa (**figura 29B**).

La expresión de PCG-1 α a las 24 horas de incubación fue significativamente mayor en las células incubadas con las más altas concentraciones de glucosa que en las incubadas con las más bajas (**figura 30A**). La insulina incrementó la expresión del PCG-1 α de las células incubadas con 2,5 y 5,5 mM de glucosa y la disminuyó cuando la concentración fue más elevada. El GLP-2 solo incrementó significativamente la expresión del coactivador en las células incubadas con 5,5 mM de glucosa, mientras que la disminuyó en las células incubadas con 2,5 y 25 mM de glucosa (**figura 30B**).

En relación con el metabolismo de hidratos de carbono, se valoró la expresión de los transportadores de glucosa, GLUT-1 y GLUT-2 y de las enzimas GK y GAPDH. La glucosa no alteró la expresión de GLUT-1 a corto (2 horas) ni a largo plazo (24 horas) de incubación (**figuras 31A y E**) y la insulina incrementó la expresión del transportador en las células incubadas durante 2 horas con 20 mM de glucosa (**figura 31B**) y en las incubadas durante 24

horas con la más baja concentración, mientras que a este tiempo disminuyó la expresión de las incubadas con 20 mM de glucosa (**figura 31F**). A medio plazo (4 horas), la expresión fue dependiente de la concentración de glucosa, presentando el mínimo valor a 5,5 mM, para luego aumentar linealmente hasta alcanzar el efecto máximo en las células incubadas con 20 mM (**figura 31C**). A las 4 horas, la insulina tendió a disminuir la expresión de GLUT-1 en las células incubadas con las más bajas concentraciones de glucosa, presentando el mínimo valor en presencia de 5 mM. Luego aumento linealmente la expresión hasta alcanzar el máximo en las células incubadas con 15 mM, para volver a ser inferior a la de los controles incubados con 20 mM de glucosa (**figura 31D**).

La glucosa produjo un incremento significativo de la expresión de GLUT-2 a las 2 y 24 horas de incubación (**figuras 32A y C**). La presencia de insulina durante 2 horas (**figura 32B**) incrementó la expresión solo en los astrocitos incubados con 2,5 y 5 mM de glucosa, mientras que a las 24 horas produjo un efecto trifásico sobre la expresión del GLP-2, alternando valores superiores con otros iguales o inferiores que los observados en los controles (**figura 32 D**). Curiosamente, la glucosa produjo una ligera, aunque no significativa, disminución de la expresión de GLUT-2 a las 18 horas de incubación (**figura 32E**). La adición de insulina y de GLP-2 produjeron un incremento lineal de la expresión del transportador a las concentraciones de glucosa estudiadas, siendo mayor el efecto del GLP-2 que el de la insulina (**figura 32F**). Además, a las 24 horas de incubación en presencia de 17,5 mM de glucosa (**figura 32G**), la expresión de GLUT-2 fue dosis-dependientemente incrementada por GLP-2, siendo 7,5 veces mayor en presencia de 1000 nM que en ausencia del péptido.

A las 24 horas, la expresión de GK fue máxima en los astrocitos incubados con 5,5 mM de glucosa (**figura 33 A**). La adición de GLP-2 solo afectó (aumentando) la expresión de las células incubadas con 25 mM de glucosa, mientras que la insulina produjo un efecto parabólico sobre dicha expresión, siendo significativamente mayor en las células incubadas con 2,5 y 25

mM de glucosa y significativamente menor en las incubadas con 5,5 y 15 mM que en las células control (**figura 33B**).

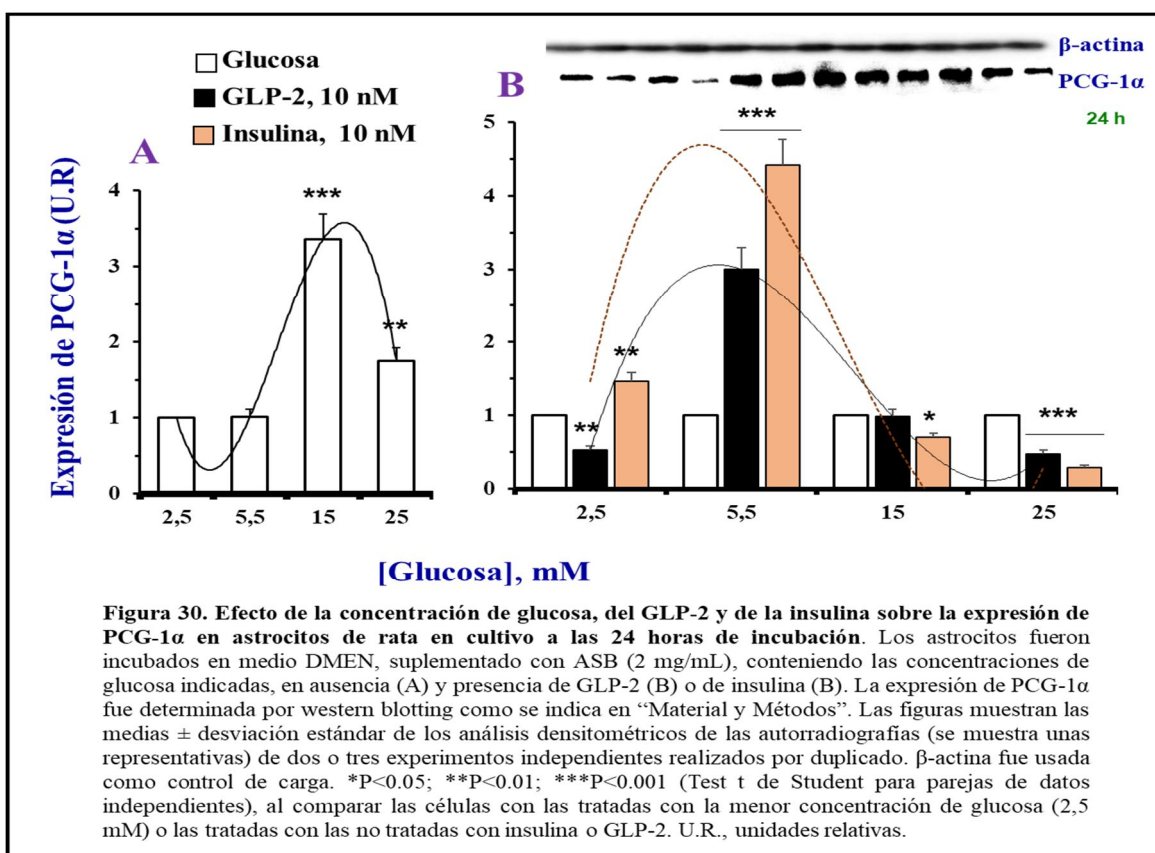
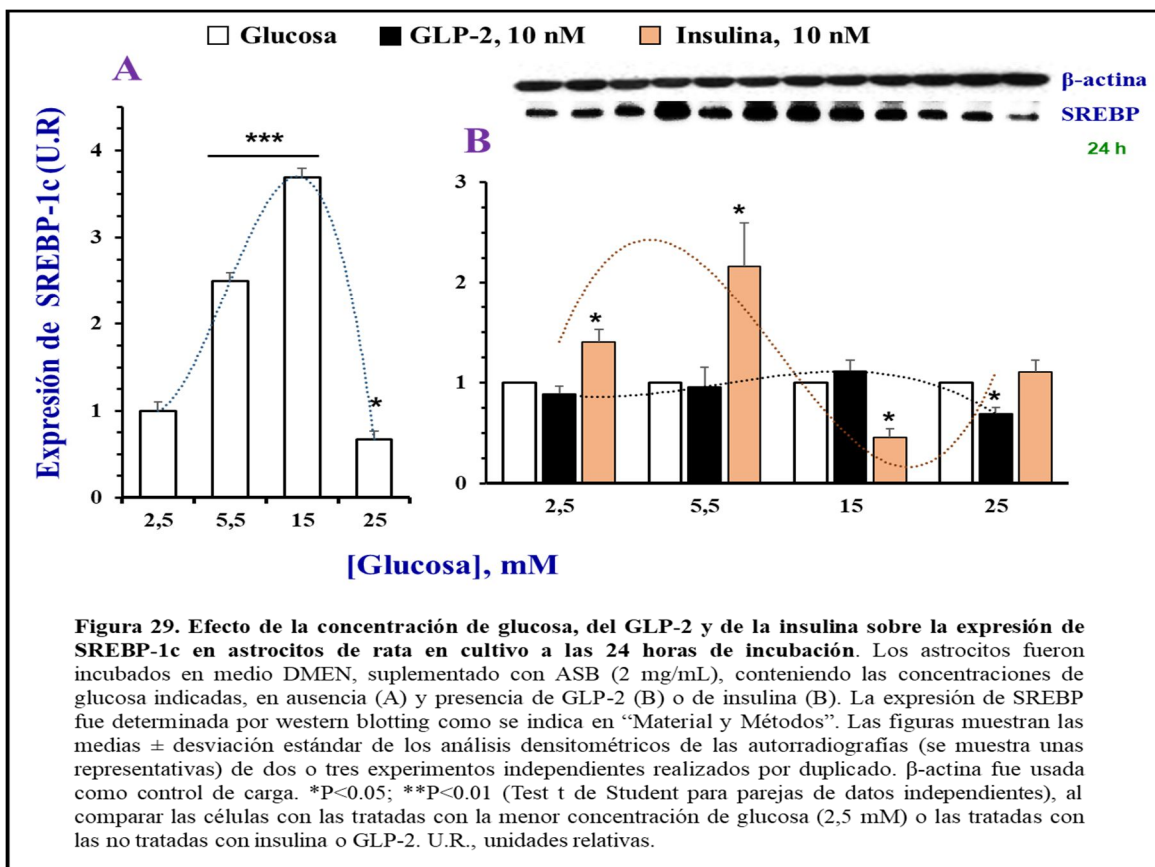
A las 24 horas de incubación, la expresión de GAPDH no se modificó ni por el aumento de la concentración de glucosa, ni por la adición de GLP-2 o de insulina, salvo cuando las células fueron expuestas a un medio conteniendo 25 mM de glucosa, en las que la expresión fue superior a la encontrada en presencia de menores concentraciones de glucosa (**figura 34 A**) y la insulina produjo un significativo descenso (**figura 34B**).

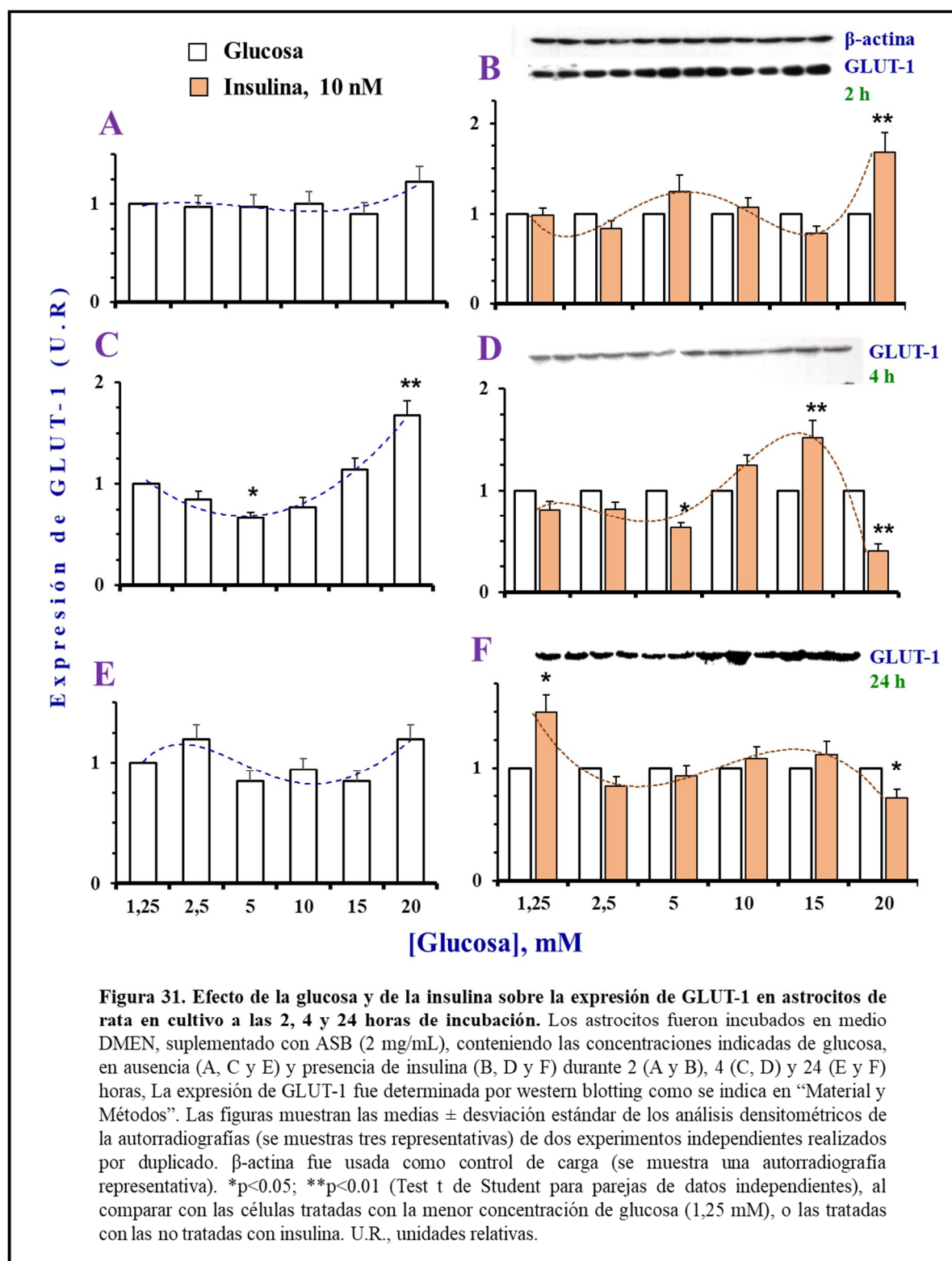
A las 24 horas de incubación, la expresión de la ACC presentó un comportamiento parabólico en función de la concentración de glucosa, pero de distinto signo, dependiendo de la ausencia o presencia de GLP-2 o de insulina (**figuras 35A y B**). Además, en estas condiciones, el GLP-2, y en mayor medida la insulina, promovieron la expresión de la forma desfosforilada (**figura 35C**).

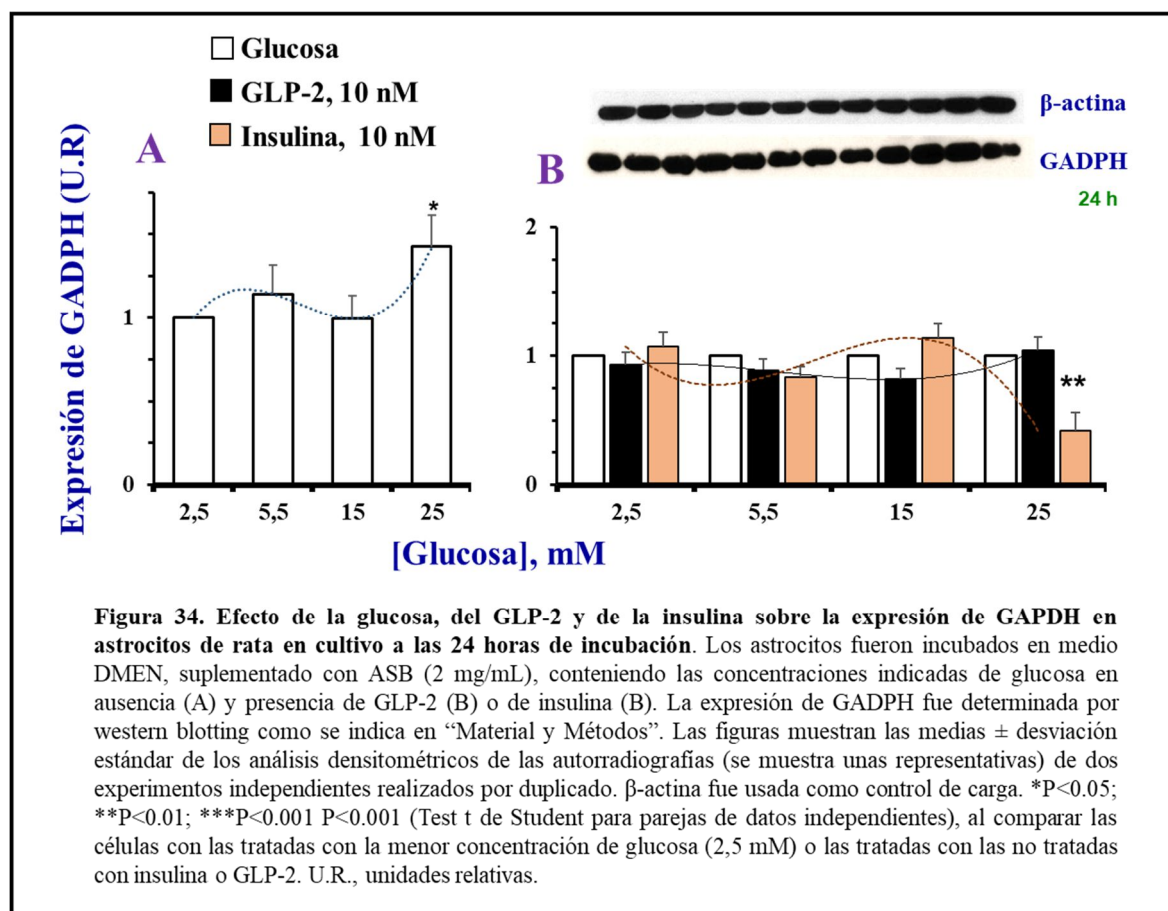
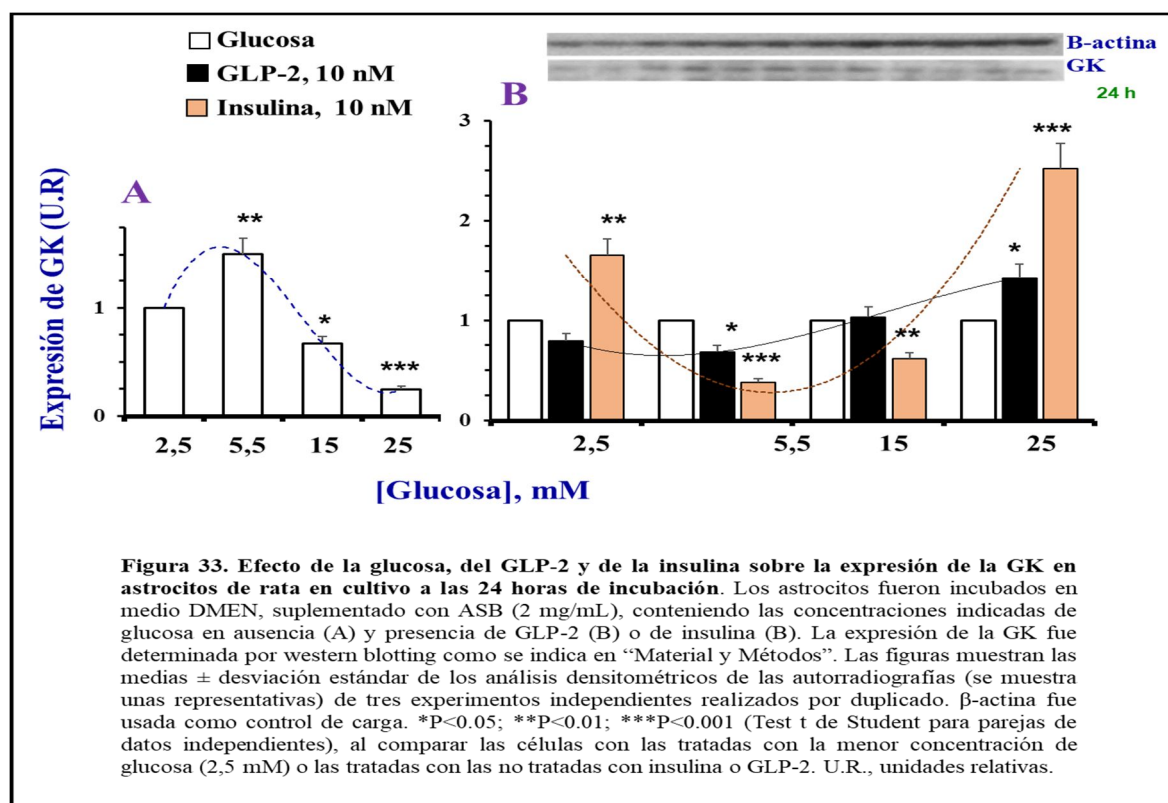
En presencia de 0,5 mM de glucosa, se estudió el efecto del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de AMPK total y fosforilada. Como se observa en la **figura 36A**, se produjo un ligero curso-temporal incremento de la proteína total, aunque solo significativo a los 60 minutos de incubación. La adición de GLP-2 no produjo efecto alguno; sin embargo, la insulina elevó el contenido de esta proteína en los primeros 15 minutos de incubación, pero no más tarde (**figura 36B**). Por otra parte, el GLP-2 disminuyó la expresión de la forma fosforilada a los 30 minutos de incubación y la incrementó a los 60 minutos. La insulina también disminuyó la expresión de la AMPK fosforilada al inicio y la elevó al final del periodo de incubación (**figura 36C**). Cuando se determinó el efecto de la glucosa sobre la expresión de la AMPK total, una disminución y un aumento dosis-dependiente fueron observados a las 2 (**figura 37A**) y 24 horas (**figura 38A**) de incubación, respectivamente. El tratamiento con insulina afectó a la expresión, dependiendo del contenido en glucosa del medio a las 2 horas (**figura 37B**), y la disminuyó de manera dosis-dependiente de glucosa a las 24 horas de incubación (**figura 38B**), mientras que la adición de

GLP-2 produjo un ligero incremento de la expresión en las células incubadas con las mayores concentraciones de glucosa ensayadas (**figura 38B**).

La glucosa, el GLP-2 y la insulina, no modificaron la expresión de la PASK a las 24 horas de incubación (**figuras 39A y B**). Sin embargo, la presencia de cicloheximida sí alteró el contenido total de PASK a las 24 horas de incubación, disminuyendo al aumentar la concentración de glucosa en el medio (**figura 39C**). La insulina y el GLP-2 también modificaron el contenido total de esta proteína en presencia de cicloheximida (**figura 39 D**).







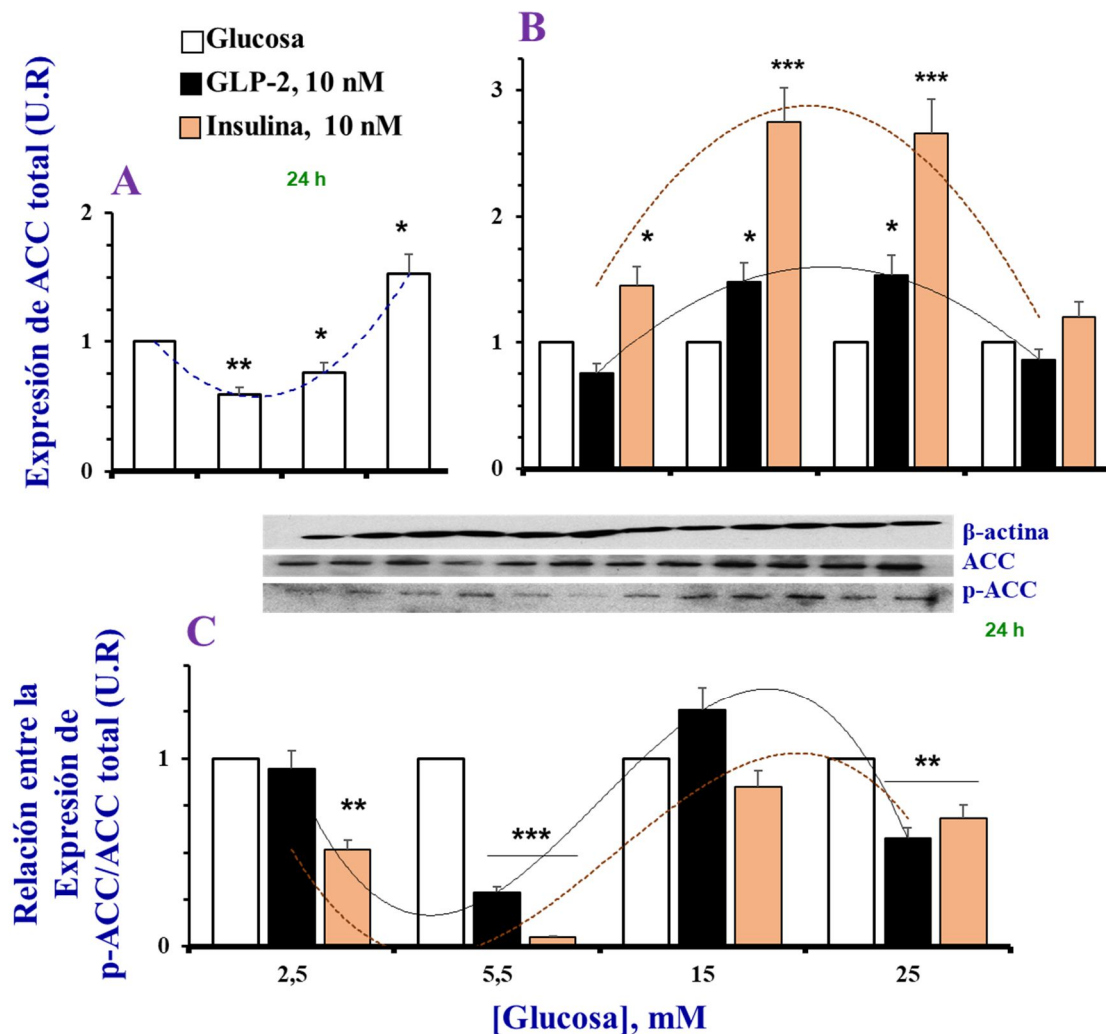
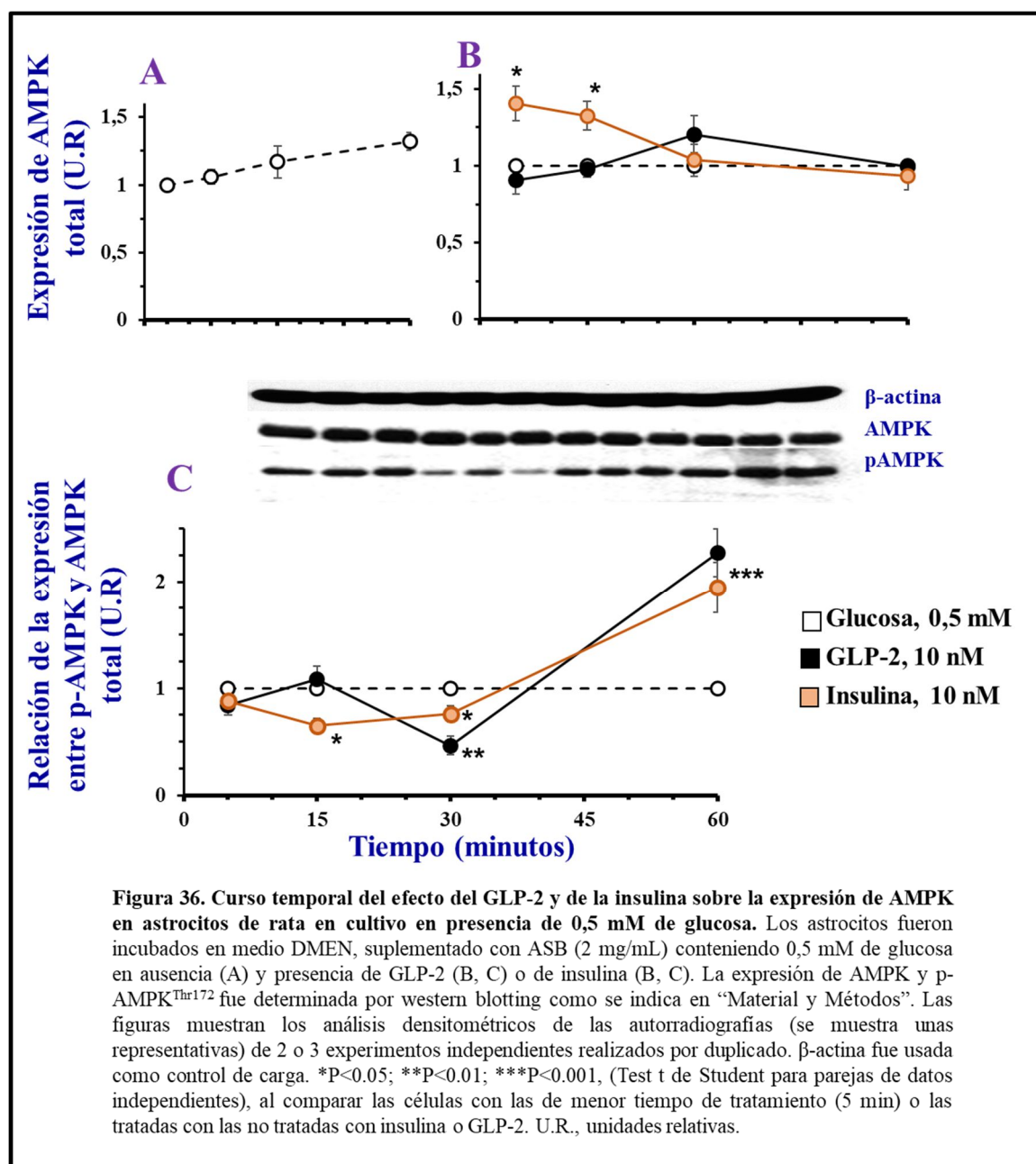


Figura 35. Efecto de la glucosa, del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de la ACC total y fosfo-ACC en astrocitos de rata en cultivo a las 24 horas de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa en ausencia (A) y presencia de GLP-2 (B) o de insulina (B). La expresión de ACC y p-ACC^{Ser79} fue determinada por western blotting como se indica en "Material y Métodos". Las figuras muestran los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra unas representativas) de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. β-actina fue usada como control de carga. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 P<0.001 (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.



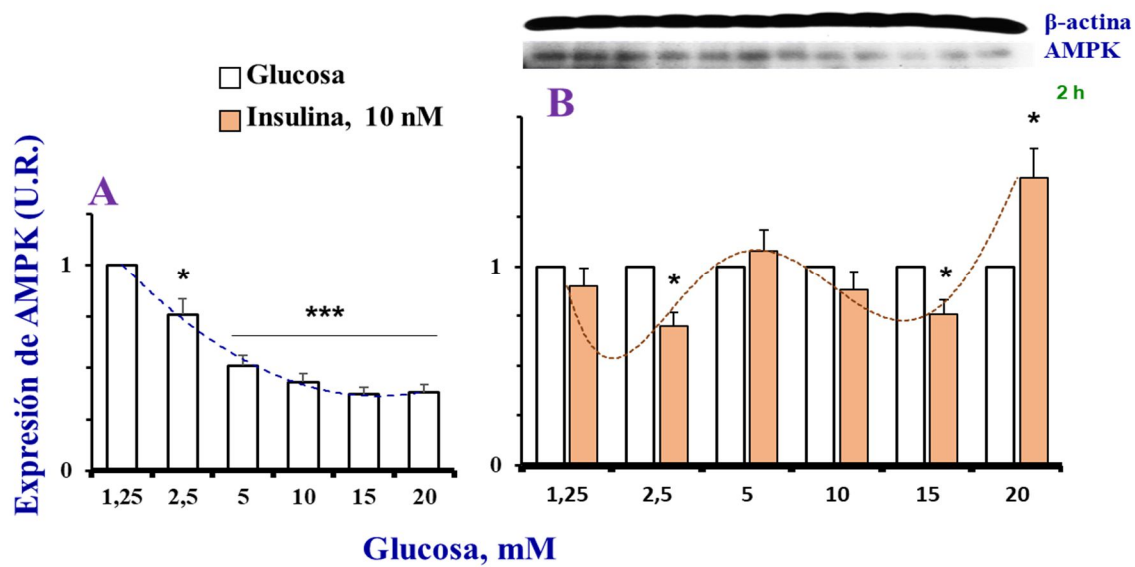
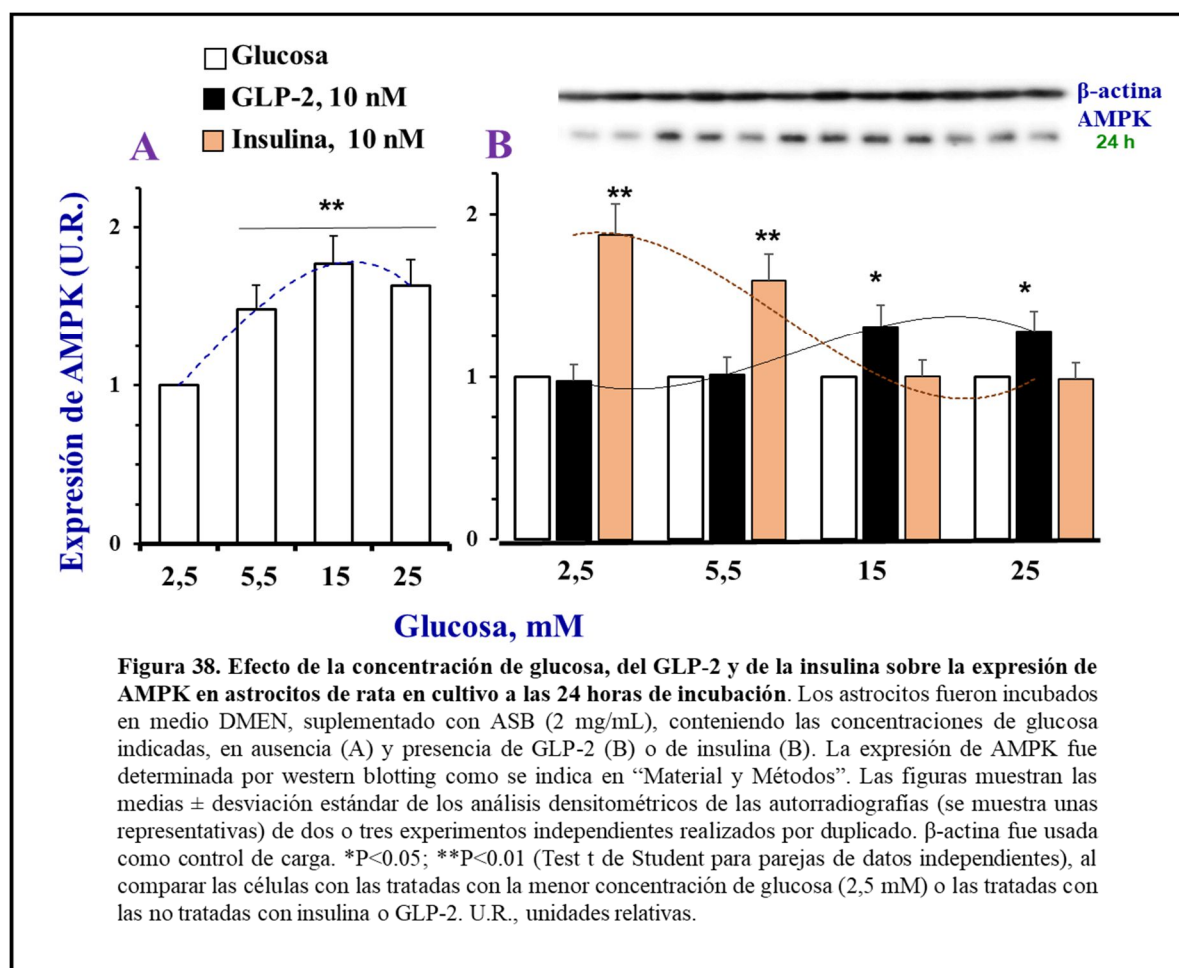


Figura 37. Efecto de la concentración de glucosa y de la insulina sobre la expresión de AMPK en astrocitos de rata en cultivo a las 2 horas de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa en ausencia (A) y presencia de insulina (B). La expresión de AMPK fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra una muestra representativa) de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (1,25 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.



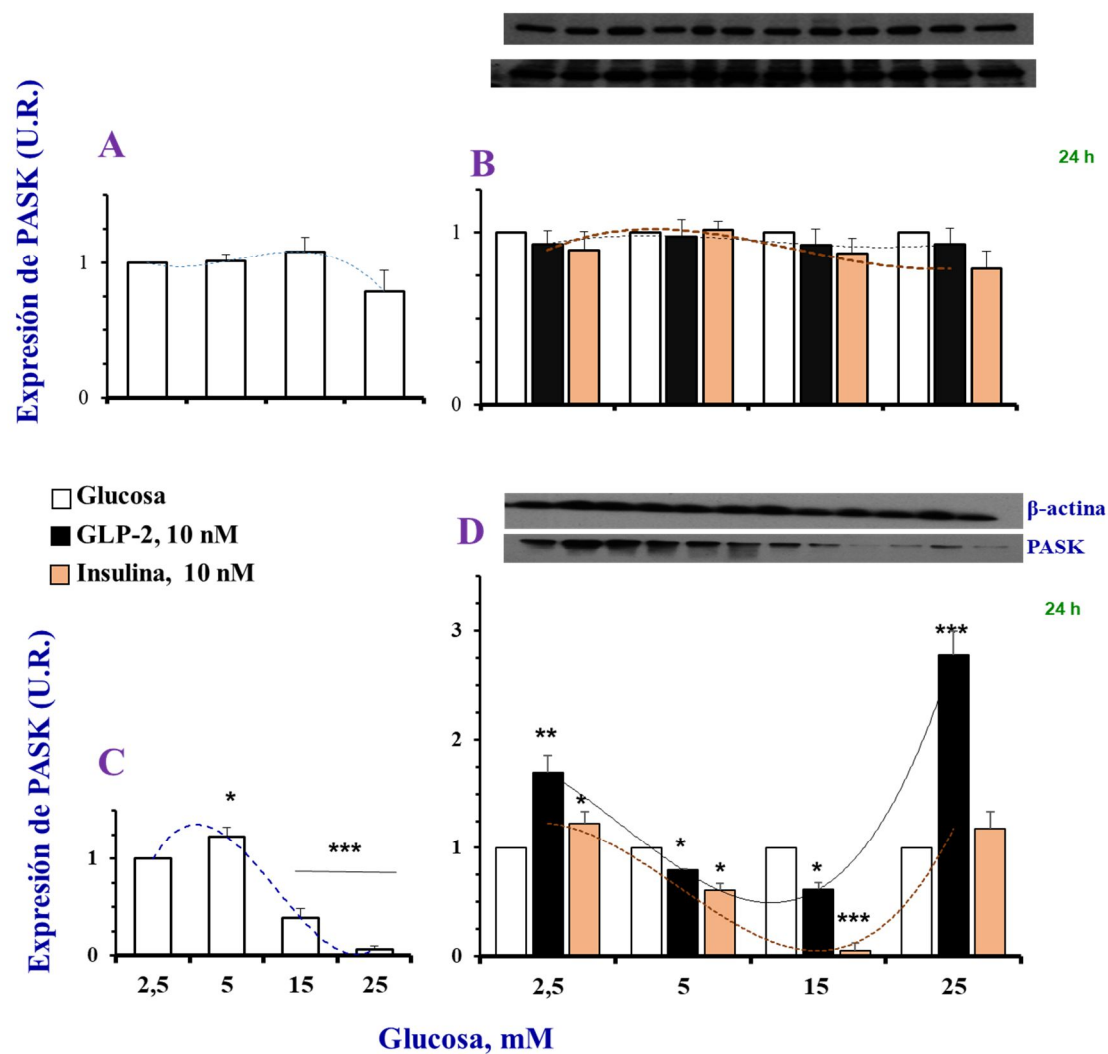


Figura 39. Efecto de la concentración de glucosa, del GLP-2 y de la insulina, en ausencia y presencia de cicloheximida, sobre la expresión de PASK en astrocitos de rata en cultivo a las 24 horas de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), en ausencia (A, B) y presencia (C, D) de 80 μ m de cicloheximida, conteniendo las concentraciones de glucosa indicadas, en ausencia (A, C) y presencia de GLP-2 (B, D) o de insulina (B, D). La expresión de PASK fue determinada por western blotting como se indica en "Material y Métodos". Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra una representativa) de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.

5. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES

La expresión del IR fue menor en presencia de las mayores concentraciones de glucosa que en la usada como referencia, tanto a los 5 minutos como a las 24 horas de incubación (**figuras 40A y C**). A los 5 minutos de incubación, la adición de insulina y de GLP-2 solo produjeron ligeras modificaciones de la expresión del IR en las células incubadas con bajas concentraciones de glucosa (**figura 40B**). mientras que a las 24 horas la insulina produjo la máxima disminución de la expresión en las células incubadas con las mayores concentraciones de glucosa (**figura 40D**). El GLP-2 también disminuyó la expresión del IR, salvo en presencia de 5,5 mM de glucosa (**figura 40D**).

A los 5 minutos de incubación, la mayor expresión de IGF-1R fue observada en presencia de 5,5 y 15 mM de glucosa, disminuyendo hasta valores inferiores a los de los controles en las células incubadas con más alta concentración (**figura 41A**). Por el contrario, a las 24 horas, la expresión de IGF-1R fue máxima a la más baja concentración de glucosa usada (**figura 41C**). En general, la expresión fue igual o superior a la de los controles en las células tratadas con insulina y con GLP-2, salvo en presencia de 15 mM de glucosa, a los 5 minutos de incubación (**figuras 41B y D**).

A los 5 minutos de incubación, la menor expresión del IRS-1 fue observada en las células incubadas con elevadas concentraciones de glucosa (**figura 42A**). En general, la adición de insulina produjo un nuevo incremento y la de GLP-2 no afectó a la expresión, salvo en las células incubadas con 5,5 mM de glucosa, en que ambos tratamientos produjeron una significativa disminución de la expresión comparada con la de los controles (**figura 42B**). La expresión de fosfo-IRS-1-Y612 fue creciendo ligeramente con el aumento de la concentración de glucosa, alcanzando un máximo en presencia de 15 mM y disminuyendo luego bruscamente hasta valores

de expresión de aproximadamente la mitad de la observada en las células control (**figura 42C**). La adición de insulina produjo un significativo incremento y la de GLP-2, un significativo descenso de la fosforilación en tirosina a los 5 minutos de incubación (**figura 42D**). En este corto periodo de tiempo, la expresión del fosfo-IRS-1-S636/639 fue decreciendo de manera dosis-dependiente con el aumento de la concentración de glucosa (**figura 42E**), sin que la adición de insulina o de GLP-2 produjera efecto alguno (**figura 42F**). A los 10 minutos de incubación, la expresión de IRS-1 aumentó ligeramente en presencia de la más alta concentración de glucosa (**figura 43A**). El GLP-2 no produjo efecto alguno y la insulina incrementó significativamente la expresión en las células incubadas con 2,5 y 15 mM de glucosa (**figura 43B**). Por otra parte, el efecto del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión del IRS-1 fosforilado en serina fue cualitativamente similar a los 10 minutos de incubación, disminuyéndola en presencia de 2,5 y 15 mM de glucosa y aumentándola en las células incubadas con 5,5 y 25 mM (**figura 43C**). A las 24 horas de incubación, 15 mM de glucosa produjo la máxima expresión de IRS-1 (**figura 44A**). El tratamiento con GLP-2 incrementó la expresión en las células incubadas con 5,5 y 15 mM de glucosa, mientras que la adición de insulina incrementó la expresión en las incubadas con 2,5 y 5,5 mM (**figura 44B**). Además, la expresión de IRS-1 fosforilada en serina fue incrementada por la insulina en las dos condiciones estudiadas, mientras que el GLP-2 solo la incrementó en las células mantenidas en normoglucemia (**figura 44C**). Cuando las células se estimularon en presencia de cicloheximida, no se observaron diferencias en la expresión del IRS-1, ni por la variación de la concentración de glucosa (**figura 45A**), ni por la adición de GLP-2 (**figura 45B**) a las 24 horas de incubación. Sin embargo, en las células estimuladas con insulina, la expresión fue siempre menor que la de sus respectivos controles y decreciendo de manera dosis-dependiente de la concentración de glucosa (**figura 45B**).

En presencia de 25 mM de glucosa, la expresión de la PI3K aumentó con el tiempo de exposición, siendo máxima a los 15 minutos de incubación (**figura 46A**), y la adición de insulina y GLP-2 solo incrementó la expresión al inicio del periodo experimental (**figura 46B**). Ambos péptidos también aumentaron la expresión de la forma fosforilada de la PI3K a los 15 min de incubación, para decaer de forma sostenida hasta situarse por debajo de los controles a los 60 minutos (**figura 46C**).

A las 24 horas de incubación, la expresión de Akt fue significativamente mayor en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (**figura 47A**) e incrementada por el tratamiento con insulina y GLP-2, independientemente de la concentración de glucosa en el medio, salvo en las células mantenidas en 25 mM de glucosa (**figura 47B**). Además, la insulina incrementó la expresión de la forma fosforilada de la Akt (fosfo-Akt-S473), mientras que el GLP-2 la disminuyó (**figura 47C**). Por el contrario, en los astrocitos mantenidos durante 60 minutos en medio conteniendo 0,5 mM de glucosa, la expresión de Akt fue significativamente menor en las células tratadas con GLP-2 y con insulina que en los controles, salvo a los 30 minutos de incubación (**figura 48**).

A las 24 horas de incubación, la menor expresión de la GSK3 α fue observada en las células mantenidas en medio conteniendo 2,5 mM de glucosa, mientras que la expresión de la GSK3 β fue máxima a esa misma concentración de glucosa (**figuras 49A y C**). El tratamiento con insulina incrementó la expresión de la GSK3 α de los astrocitos incubados con 2,5 mM de glucosa, disminuyendo en las incubadas en presencia de 5,5 mM, como también ocurrió por la adición de GLP-2; ninguno de los tratamientos afectó la expresión de las células incubadas con mayores concentraciones de glucosa (**figura 49B**). Por el contrario, la expresión de la GSK3 β fue incrementada por la insulina en las células incubadas con 15 mM de glucosa y por el GLP-2 y la insulina, en las incubadas con 25 mM, sin que se afectaran las células mantenidas en otras condiciones (**figura 49D**). El nivel de fosforilación se determinó simultáneamente en las

isoformas α y β . A los 5 minutos (**figura 50A**), la expresión de la fosfo-GSK3 $\alpha\beta$ -S21/S9 fue máxima en las células incubadas con 5,5 mM de glucosa, disminuyendo luego linealmente hasta alcanzar la mínima expresión en presencia de 25 mM. A las 24 horas (**figura 50C**), la expresión presentó un máximo en las células mantenidas con 2,5 mM de glucosa y la menor en las incubadas con 15 mM. La insulina incrementó la fosforilación de GSK3 de las células incubadas con baja y muy alta concentración de glucosa durante 5 minutos, sin afectar la expresión de las incubadas en otras condiciones, mientras que la adición de GLP-2 produjo una disminución de la fosforilación en todas las células, salvo en las incubadas con 25 mM de glucosa (**figura 50B**). A las 24 horas de incubación (**figura 50D**), la expresión de la fosfo-GSK3 $\alpha\beta$ de las células incubadas con insulina y GLP-2 fue menor que la de los controles mantenidos en presencia de 5,5 mM de glucosa y mayor que la de los mantenidos con 15 mM. La insulina también incrementó la expresión de los astrocitos incubados con 25 mM de glucosa.

A los 5 minutos de incubación, la expresión de mTOR experimentó un crecimiento dosis-dependiente de la concentración de glucosa (**figura 51A**). La adición de GLP-2 incrementó la expresión en las células incubadas con 5,5 mM de glucosa, mientras que el tratamiento con insulina aumentó la expresión de mTOR independientemente de la concentración de glucosa en el medio (**figura 51B**). El GLP-2 y la insulina aumentaron la expresión relativa de la forma fosforilada de mTOR en presencia de 2,5 y de 25 mM de glucosa, siendo generalmente menor en las células incubadas con otras concentraciones de glucosa (**figura 51C**). En presencia de 25 mM de glucosa, la expresión de mTOR fue significativamente mayor cuando se valoró a los 15-60 minutos de incubación que a los 5 minutos (**figura 52A**). La adición de GLP-2 no tuvo efecto y el mayor efecto estimulador de la insulina fue observado a los 5 minutos de incubación (**figura 52B**). La fosforilación de mTOR fue significativamente estimulada por la insulina y el GLP-2 a los 5 minutos de incubación, no teniendo efecto a los 15 y 30 minutos y disminuyendo ambos el contenido en mTOR fosforilado a los 60 minutos (**figura 52C**).

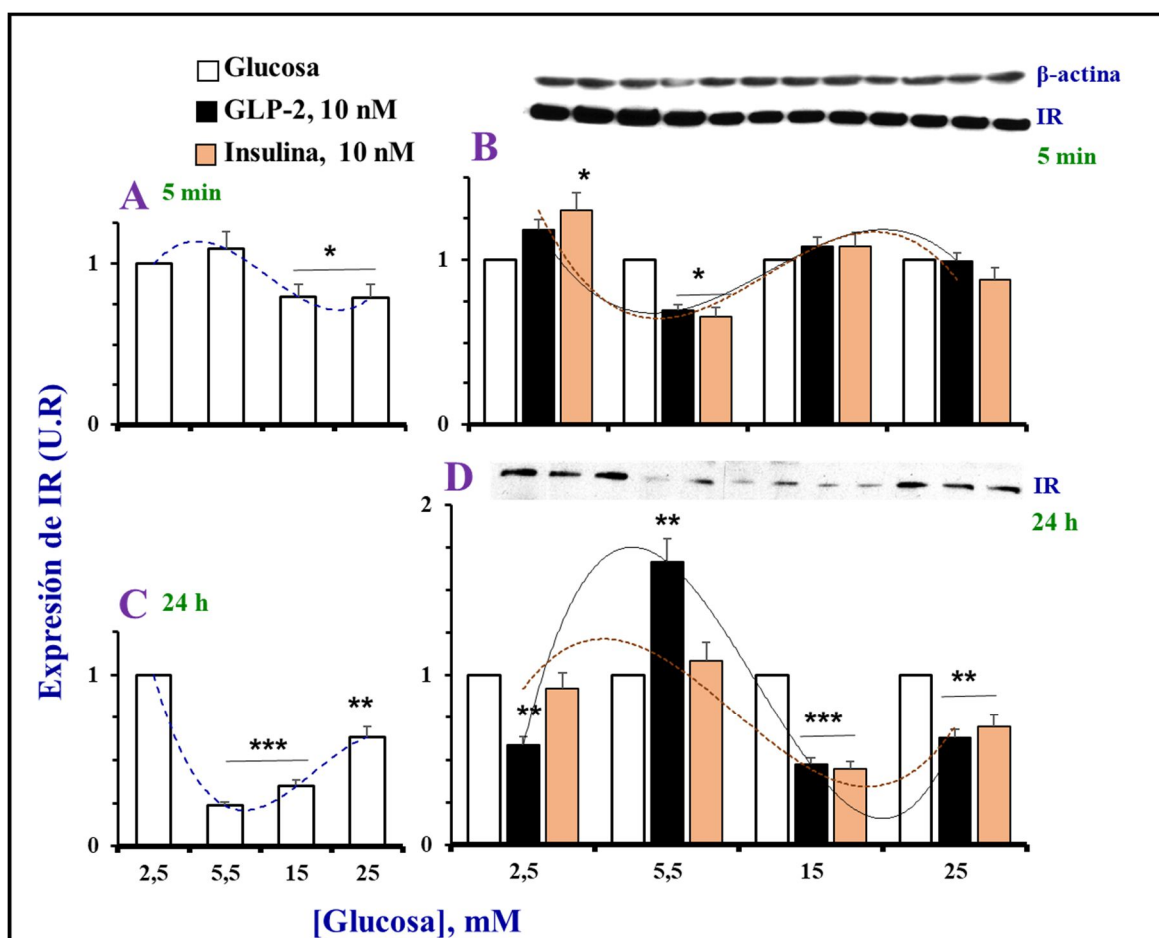
A las 24 horas de incubación, la expresión de mTOR disminuyó linealmente de manera dependiente de la concentración de glucosa (**figura 53A**). El tratamiento con GLP-2 o con insulina no modificó la expresión observada en las células control a ninguna de las concentraciones de glucosa ensayadas (**figura 53B**), pero sí afectó la expresión de la forma fosforilada. Así, la adición de GLP-2 o de insulina aumentaron la expresión de fosfo-mTOR-S2448 de las células incubadas con 2,5 y 15 mM de glucosa, respectivamente, y la disminuyeron o no tuvieron efecto sobre las células mantenidas en presencia de otras concentraciones de glucosa (**figura 53C**).

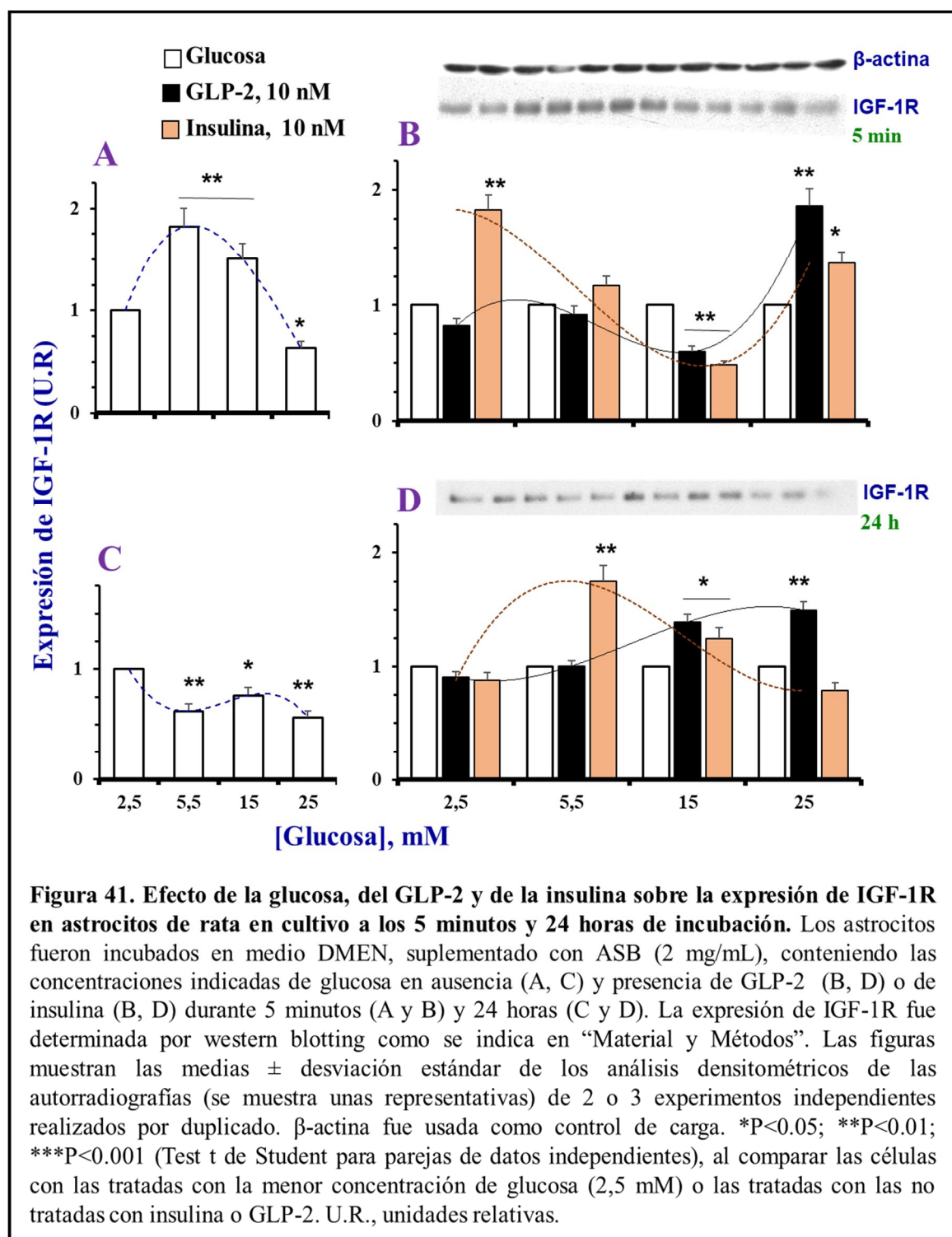
A las 24 horas de incubación, la mayor expresión de P70S6K fue observada en las células incubadas con 15 mM de glucosa (**figura 54A**). La adición de GLP-2 o de insulina disminuyó la expresión de la proteína total (**figura 54B**), y aumentó la expresión de la proteína fosforilada (**figura 54C**), respecto a la obtenida en los controles, independientemente de la concentración de glucosa en el medio.

La máxima expresión de la S6, a las 24 horas de incubación, fue observada en las células incubadas con 2,5 mM de glucosa (**figura 55A**). La adición de insulina incrementó la expresión en las células incubadas con medios conteniendo hasta 15 mM de glucosa, pero la disminuyó respecto a las mantenidas en 25 mM. Por su parte, el GLP-2 produjo un efecto bifásico sobre la expresión de S6, alternando condiciones en las que producía incremento con otras en las que la expresión fue menor (**figura 55B**). El GLP-2 también produjo un efecto bifásico sobre la expresión de la fosfo-S6, pero de manera contraria al inducido sobre la proteína total, mientras que la insulina no modificó la expresión de la forma fosforilada (**figura 55C**).

A los 5 minutos de incubación, la expresión de la ERK1/2 disminuyó con el aumento de la concentración de glucosa en el medio (**figura 56A**). El GLP-2 produjo una disminución adicional de la expresión de la proteína total en las células incubadas con 5,5 mM de glucosa, sin alterar la expresión de las células incubadas en otras condiciones. La insulina, por el

contrario, incrementó la expresión de la ERK1/2 en las células incubadas con 15 mM de glucosa, produciendo una significativa disminución en las incubadas con otras concentraciones de glucosa (**figura 56B**). Sin embargo, la expresión de fosfo-ERK1/2 fue significativamente mayor en los astrocitos tratados con insulina o GLP-2 que en los no tratados, independientemente de la concentración de glucosa presente en el medio (**figura 56C**).





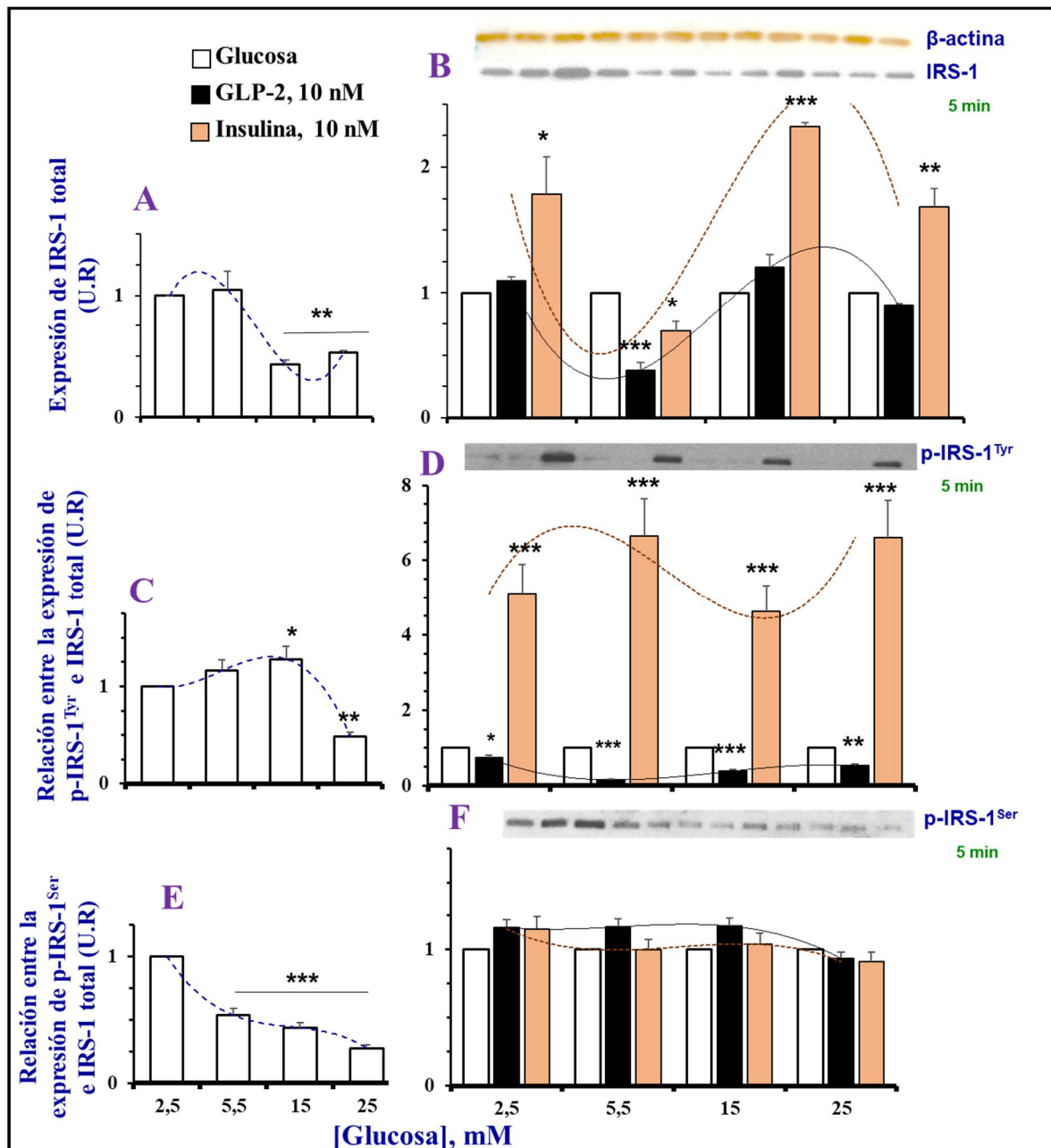
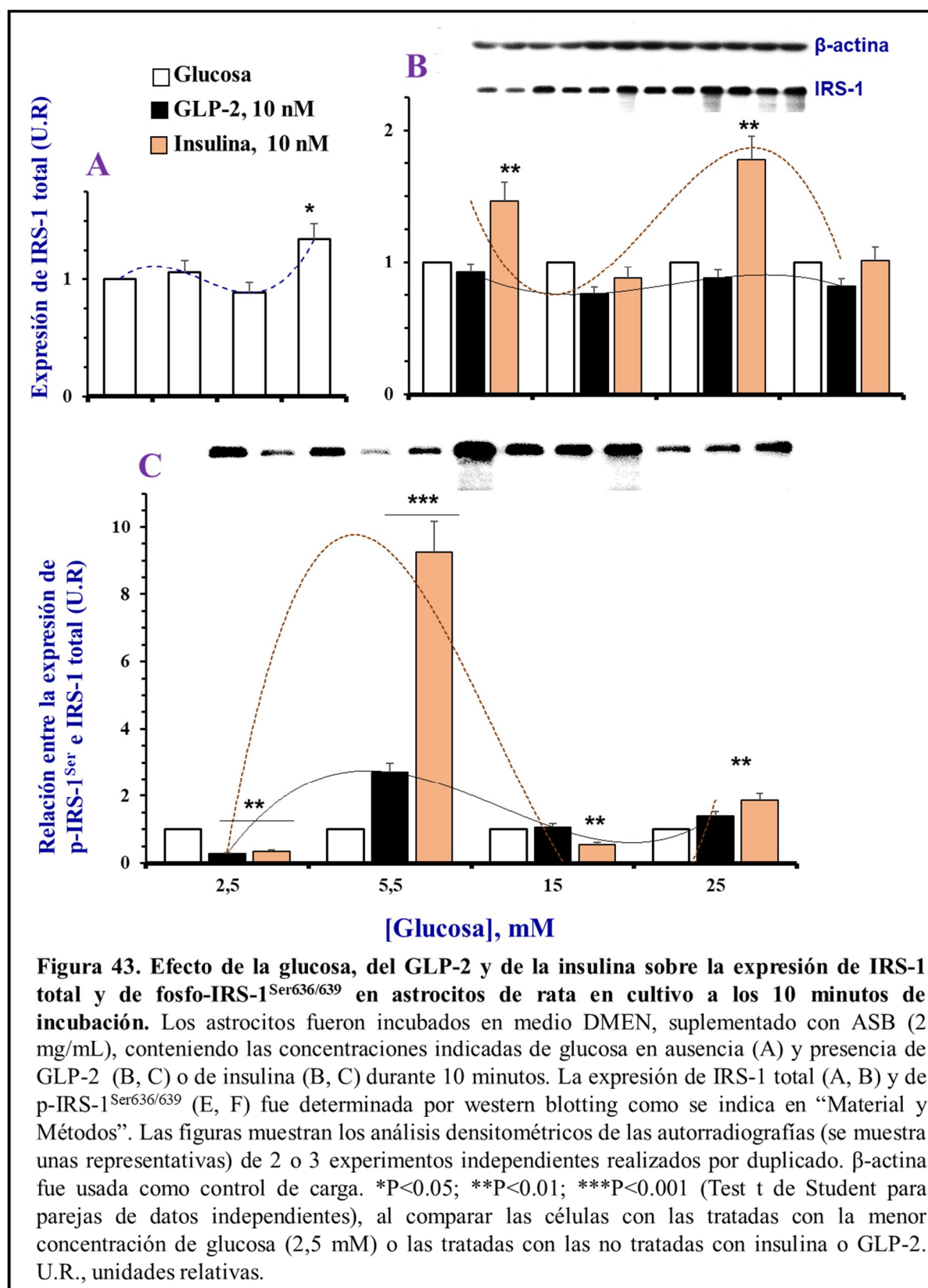
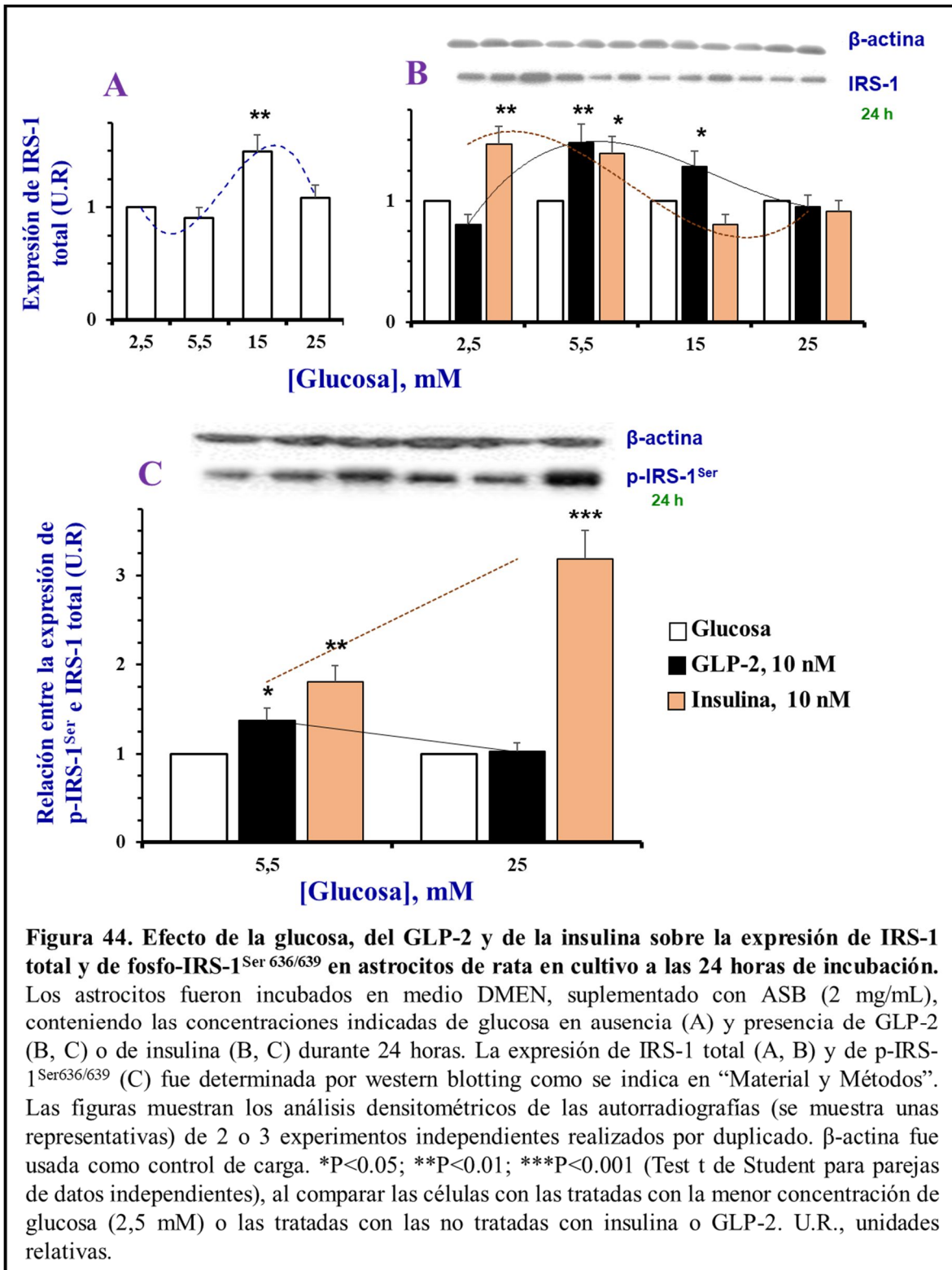
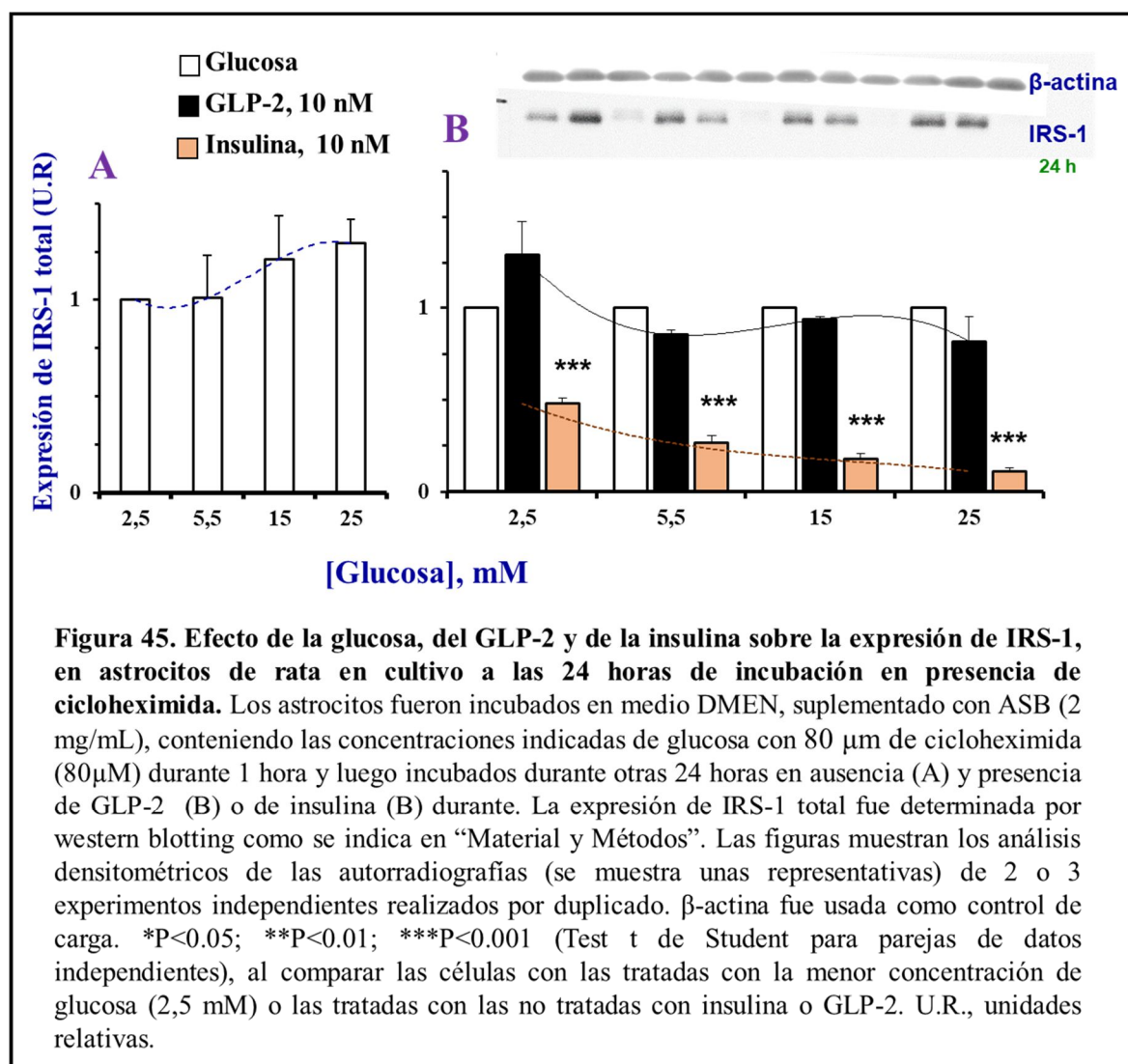


Figura 42. Efecto de la glucosa, del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de IRS-1 total, de fosfo-IRS-1^{Tyr612} y de fosfo-IRS-1^{Ser636/639} en astrocitos de rata en cultivo a los 5 minutos de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa en ausencia (A, C, E) y presencia de GLP-2 (B, D, F) o de insulina (B, D, F) durante 5 minutos. La expresión de IRS-1 total (A, B), de p-IRS-1^{Tyr612} (C, D) y de p-IRS-1^{Ser636/639} (E, F) fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra unas representativas) de 2 o 3 experimentos independientes realizados por duplicado. β-actina fue usada como control de carga. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.







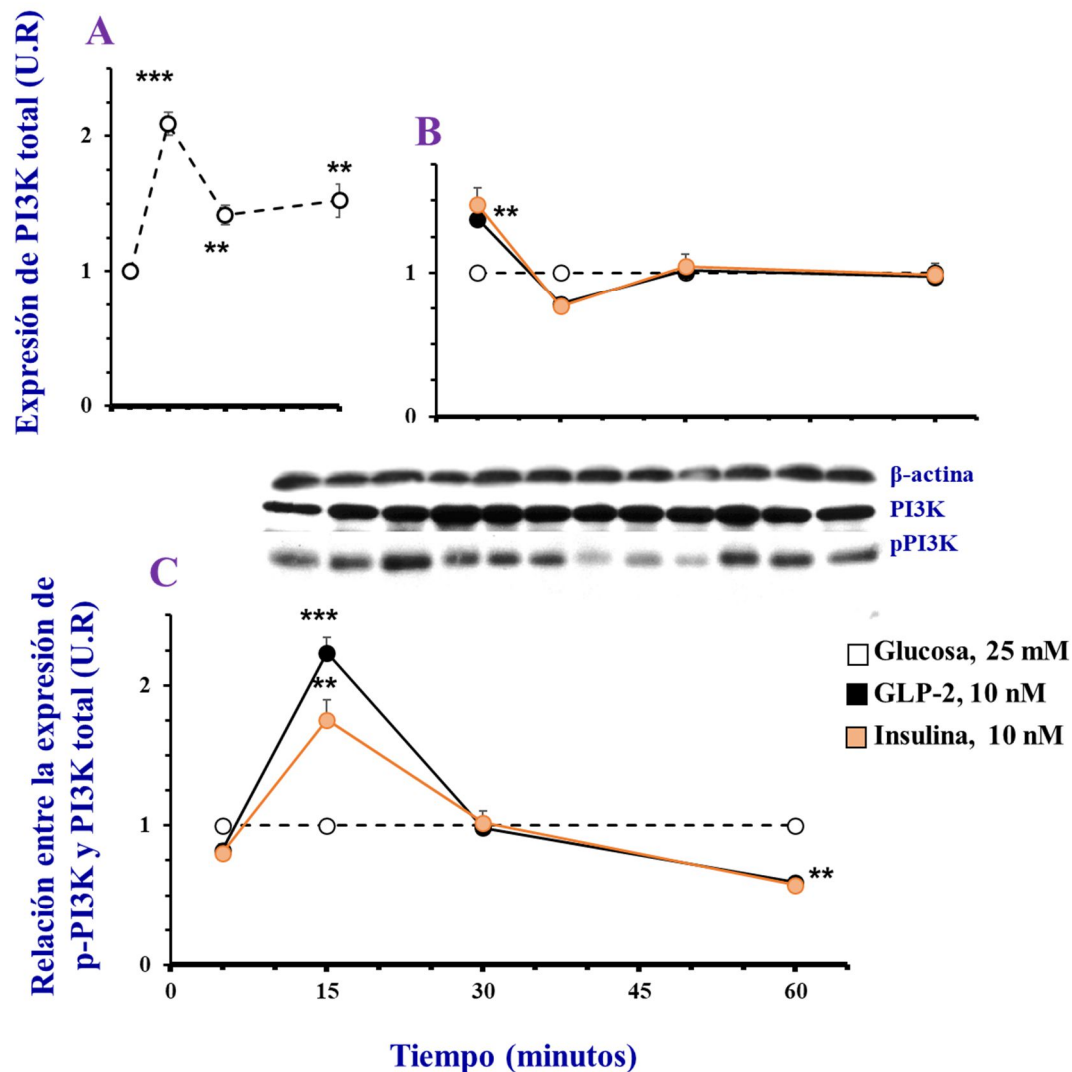
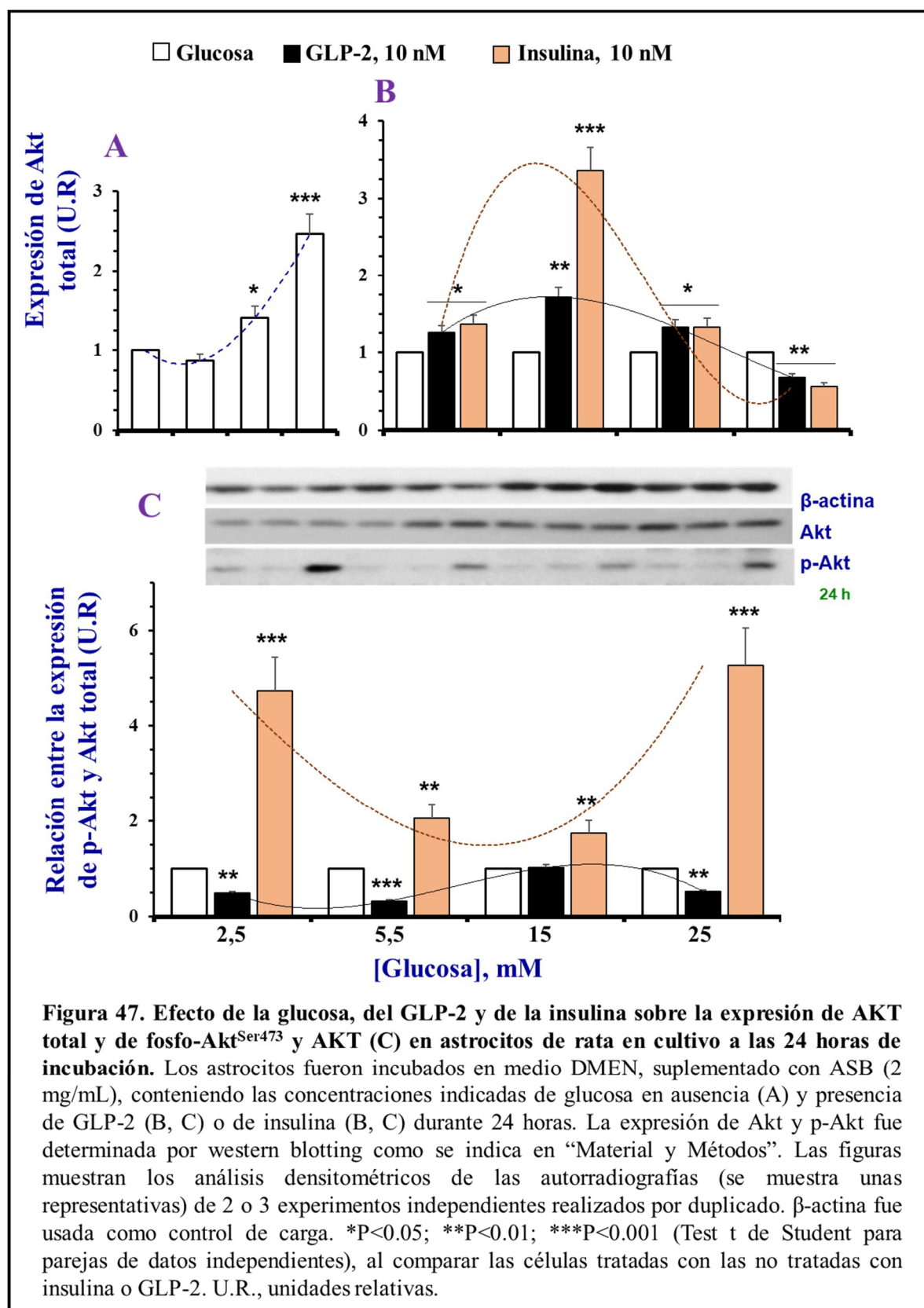
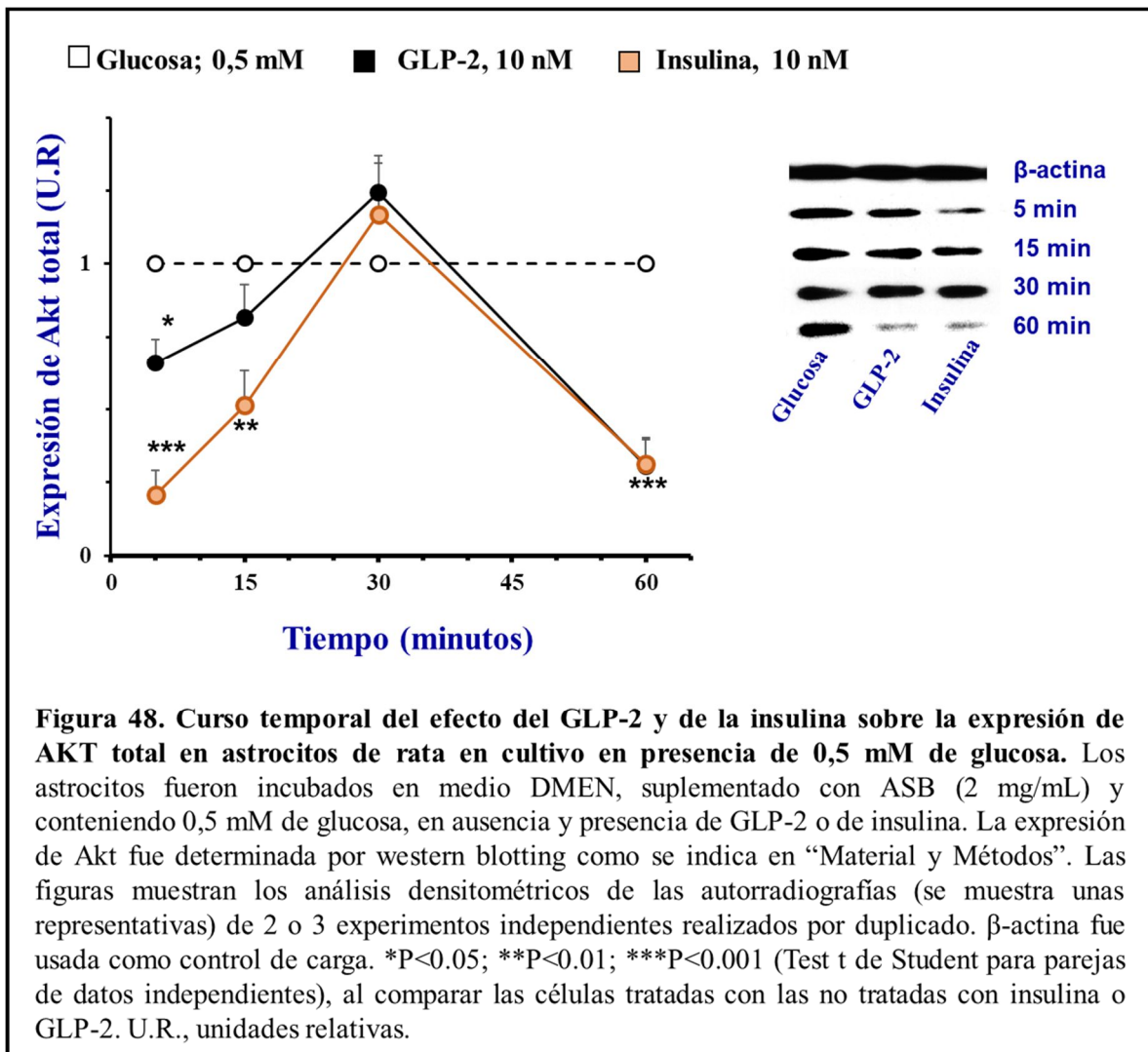
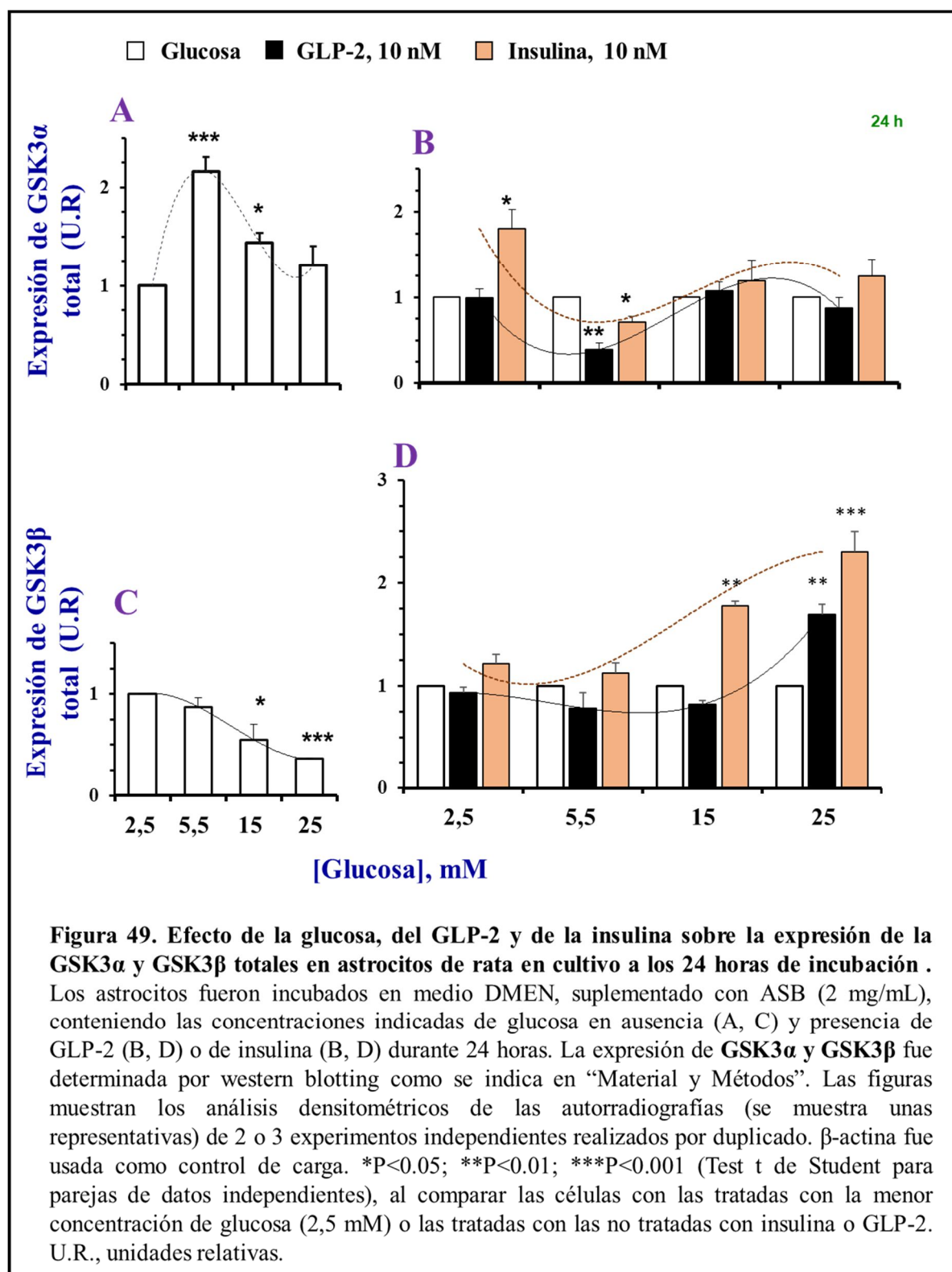


Figura 46. Curso temporal del efecto GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de PI3K total y fosfo-PI3K en astrocitos de rata en cultivo en presencia de 25 mM de glucosa. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo 25mM de glucosa en ausencia (A) y presencia de GLP-2 (B, C) o de insulina (B, C) durante los tiempos indicados. La expresión de PI3K (A, B) y de p-PI3K (C) fue determinada por western blotting como se indica en "Material y Métodos". Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra unas representativas) de 2 o 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Beta-actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las de menor tiempo de tratamiento (5 min) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.







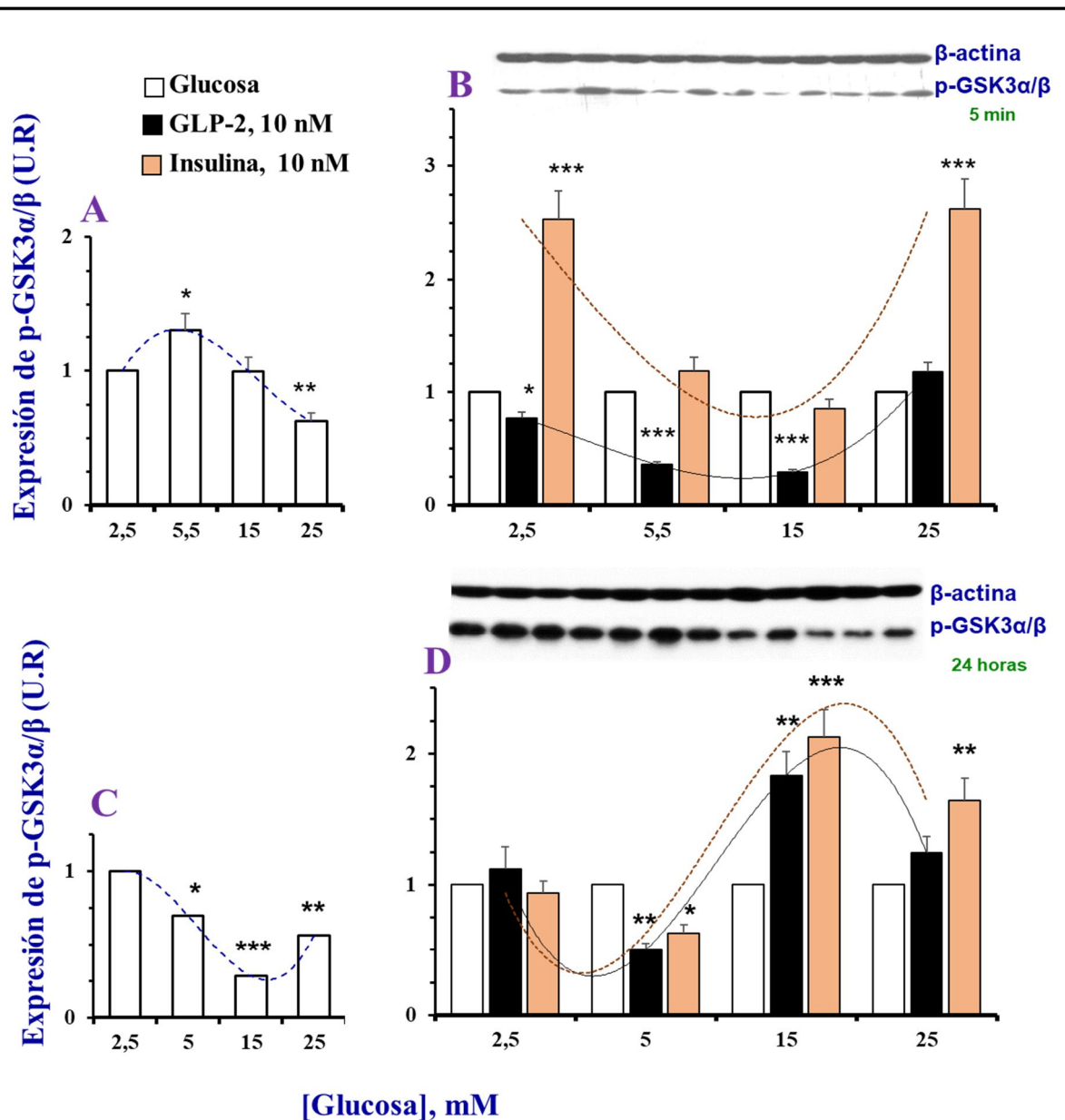


Figura 50. Efecto de la glucosa, del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de la fosfo-GSK3 $\alpha^{Ser21}/\beta^{Ser9}$ en astrocitos de rata en cultivo a los 5 minutos (A, B) y a las 24 horas (C, D) de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa en ausencia (A, C) y presencia de GLP-2 (B, D) o de insulina (B,D). La expresión de p-GSK3 $\alpha^{Ser21}/\beta^{Ser9}$ fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra unas representativas) de 2 o 3 experimentos independientes realizados por duplicado. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.

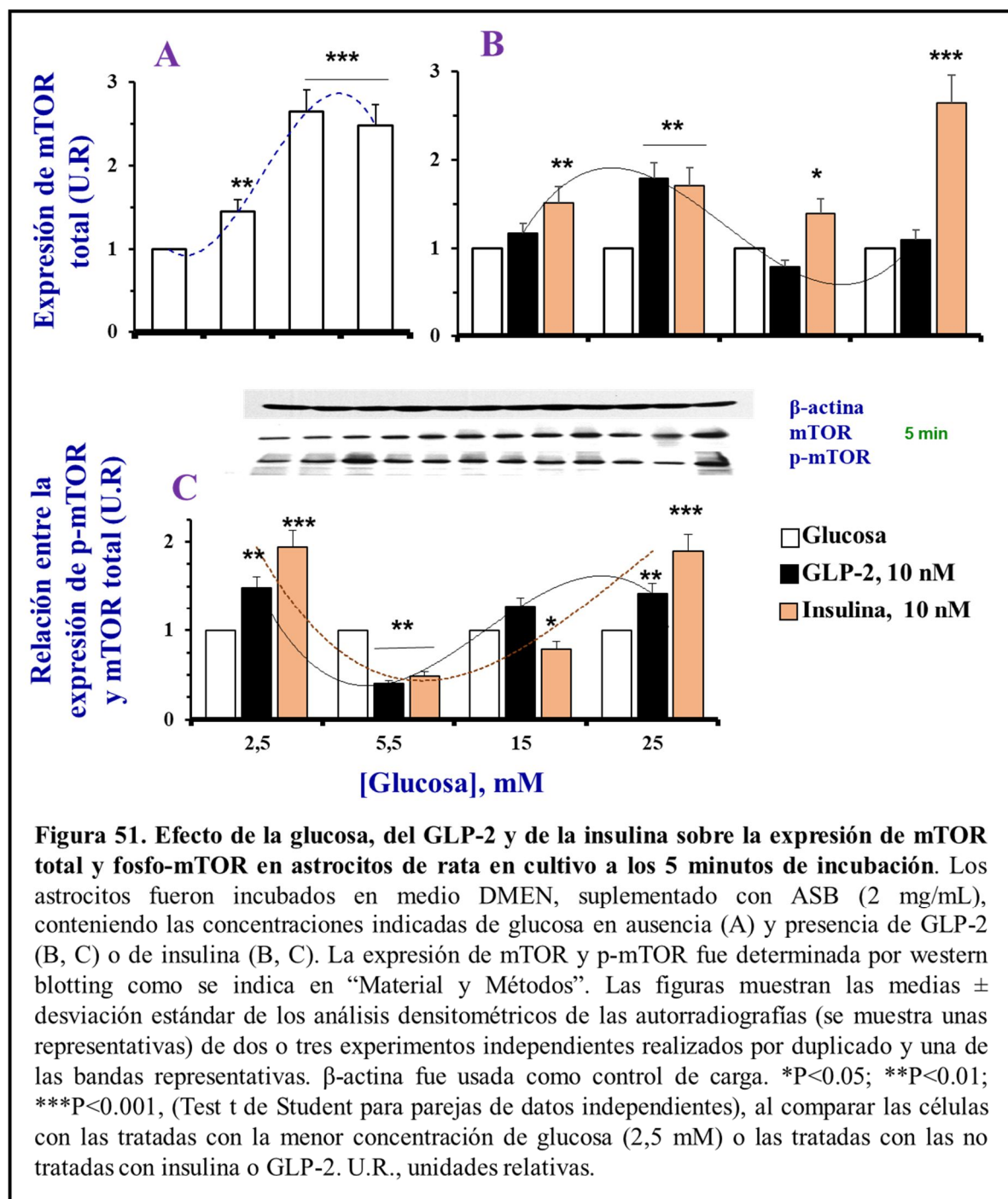


Figura 51. Efecto de la glucosa, del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de mTOR total y fosfo-mTOR en astrocitos de rata en cultivo a los 5 minutos de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa en ausencia (A) y presencia de GLP-2 (B, C) o de insulina (B, C). La expresión de mTOR y p-mTOR fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra una representativa) de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado y una de las bandas representativas. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.

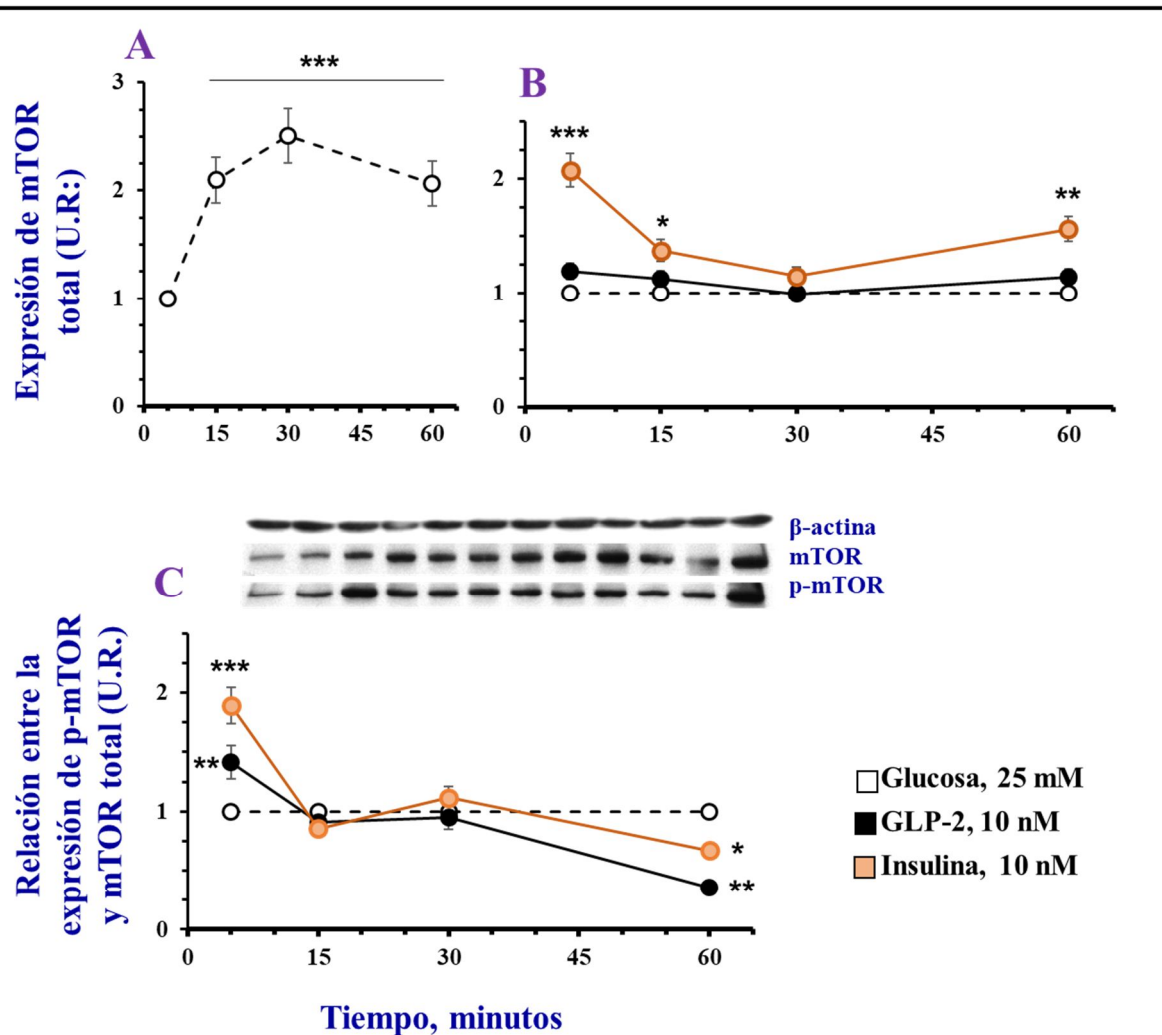
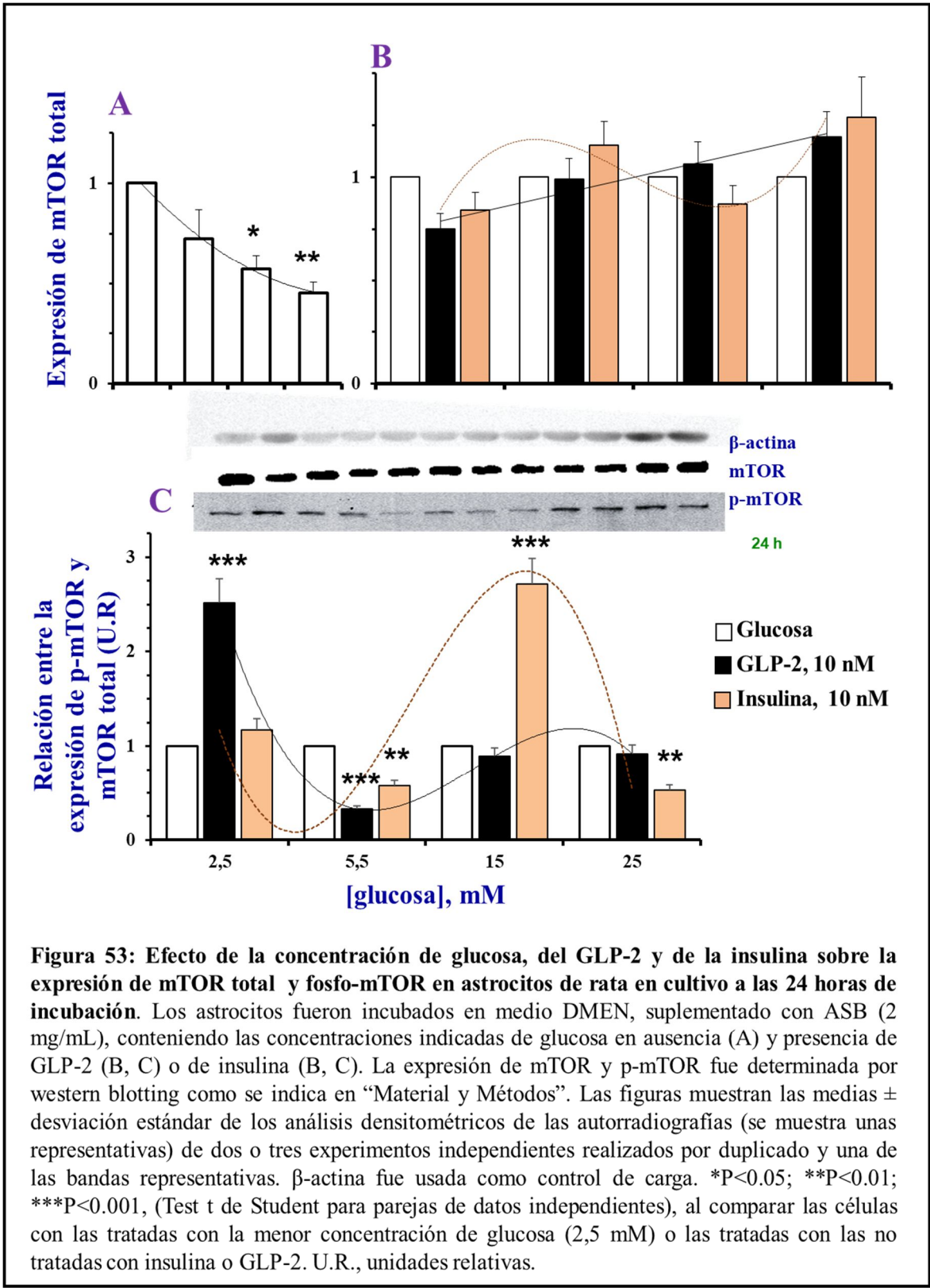


Figura 52. Curso temporal del efecto del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de mTOR total y fosfo-mTOR en astrocitos de rata en cultivo en presencia de 25 mM de glucosa. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), durante los tiempos indicados en ausencia (A) y presencia de GLP-2 (B, C) o de insulina (B, C). La expresión de mTOR y p-mTOR fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra una representativa) de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las de menor tiempo de tratamiento (5 min) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas



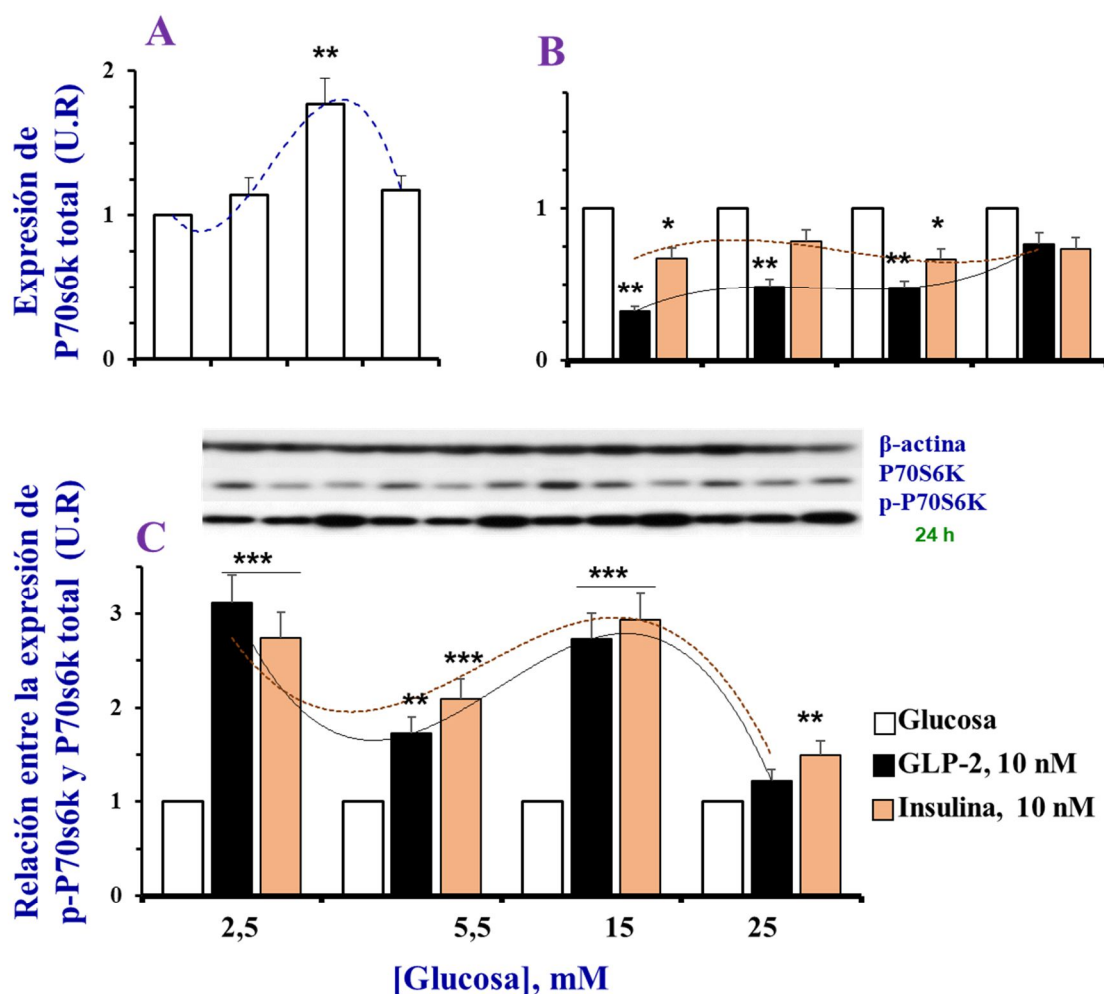
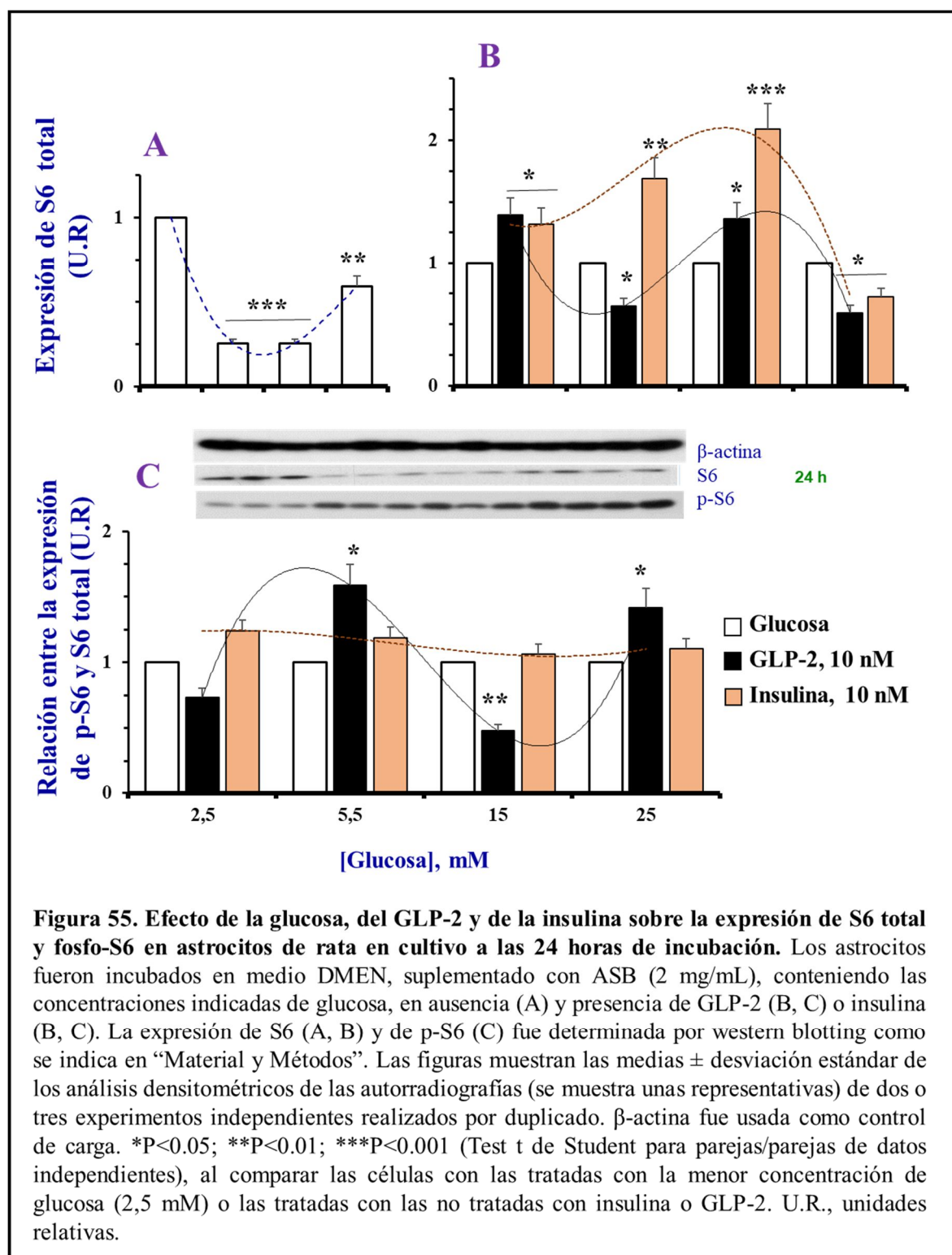


Figura 54. Efecto de la glucosa, del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de P70s6k total (A) y fosfo-P70s6k en astrocitos de rata en cultivo a las 24 horas de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa, en ausencia (A) y presencia de GLP-2 (B, C) o insulina (B, C). La expresión de P70s6k (A, B) y de p-P70s6k (C) fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra unas representativas) de tres experimentos independientes realizados por duplicado. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.



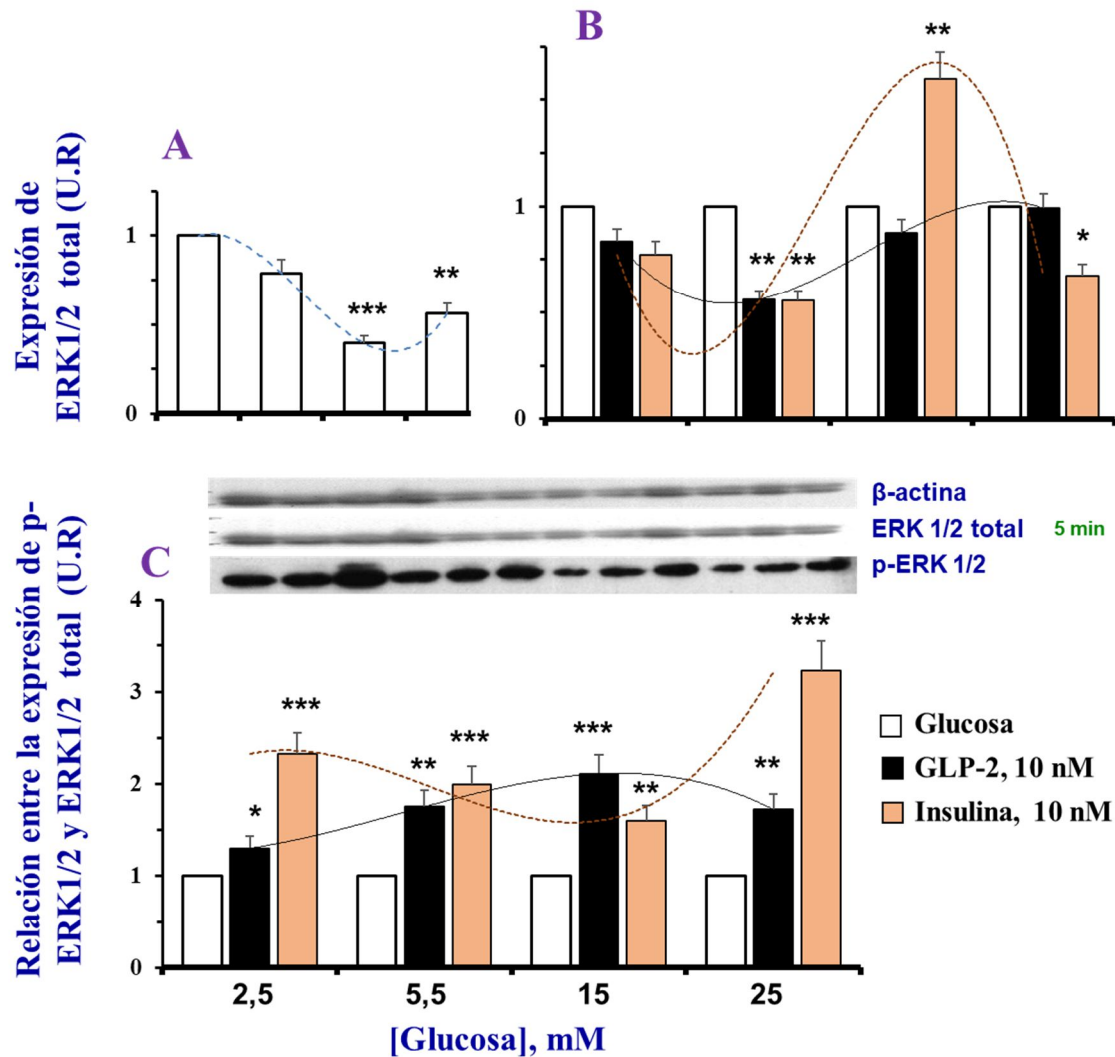


Figura 56. Efecto de la glucosa, del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión de ERK 1/2 total y de fosfo-ERK en astrocitos de rata en cultivo a los 5 minutos de incubación. Los astrocitos fueron incubados en medio DMEN, suplementado con ASB (2 mg/mL), conteniendo las concentraciones indicadas de glucosa, en ausencia (A) y presencia de GLP-2 (B, C) o insulina (B, C). La expresión de ERK (A, B) y de p-ERK (C) fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra una representativa) de tres experimentos independientes realizados por duplicado (U.R., unidades relativas). β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células con las tratadas con la menor concentración de glucosa (2,5 mM) o las tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. U.R., unidades relativas.

6. EFECTO DE LA GLUCOSA, EL GLP-2, LA INSULINA, EL EGF Y LA FORSCOLINA (EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE GLP-2), SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA (A NIVEL DE PROTEÍNA Y ARNm) DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 1$, $\beta 1$ Y $\alpha 2$ DE LA GUANILATO CICLASA SOLUBLE

A las 24 horas de incubación, la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ en la fracción celular total aumentó de forma dosis-dependiente de glucosa (**figuras 57A, C y E**). Como se observa en la **figura 57B**, el GLP-2 incrementó la expresión de la GCs $\alpha 1$ de las células incubadas con 5,5 mM de glucosa, mientras que la disminuyó o no produjo efecto en las demás condiciones estudiadas. Por el contrario, en presencia de insulina la expresión fue mayor que la de las células control, independientemente de la concentración de glucosa en el medio y el tratamiento con insulina+GLP-2 produjo un mayor efecto estimulador de la expresión que el obtenido por la insulina sola en presencia de 2,5 mM de glucosa, mientras que, en presencia de las demás concentraciones de glucosa estudiadas, el efecto obtenido fue menor.

La expresión de la GCs $\beta 1$ fue mayor en presencia de GLP-2 o de insulina que en su ausencia, salvo en la células mantenidas en 25 mM de glucosa, que fue significativamente menor (**figura 57D**). El tratamiento con insulina+GLP-2 revirtió completamente el efecto de la insulina, situando la expresión de la subunidad $\beta 1$ al mismo nivel que el de las células incubadas con GLP-2 solo, independientemente de la concentración de glucosa en el medio.

La **figura 57F** muestra que el GLP-2 tuvo un ligero efecto estimulador de la expresión de la GCs $\alpha 2$ en las células incubadas con 2,5 mM glucosa, no afectando a las células mantenidas con mayores concentraciones, salvo en aquellas expuestas a 25 mM de glucosa, en las que la expresión fue ligeramente inferior. La insulina ni tampoco la insulina+GLP-2 afectaron a la expresión, salvo en presencia de la más elevada concentración de glucosa, que fueron menores que la de los controles.

A la vista de los resultados descritos anteriormente, los siguientes experimentos se realizaron en presencia de la concentración fisiológica de glucosa (5,5 mM) durante diferentes tiempos de incubación. La expresión a nivel de proteína, de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$, se determinó en la fracción celular total y también en la fracción citosólica. La expresión a nivel de ARNm se determinó en las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$.

La expresión del ARNm/GCs- $\alpha 1$ fue menor o igual que la de los controles, salvo a las 16 horas de incubación que fue significativamente mayor (**figura 58**). La insulina, excepto a las 4 horas de incubación, indujo un significativo incremento del ARNm, mientras que la adición de insulina+GLP-2 revirtió los efectos de la insulina en todos los tiempos estudiados.

Con el fin de estudiar si los procesos de traducción y transcripción implicados en la expresión de la GCs- $\alpha 1$ coincidían en el tiempo, se determinó la expresión de la proteína en el mismo periodo de tiempo en que se valoró la formación de ARNm. Así, el GLP-2 produjo un incremento significativo de la expresión de la GCs- $\alpha 1$ que fue sostenido en el tiempo durante 24 horas en la fracción total (**figura 59A**), pero no en la fracción citosólica (**figura 59B**). Como muestra la **figura 59C**, la insulina también incrementó la expresión de la GCs- $\alpha 1$ durante todo el periodo experimental en la fracción total y, salvo en la primera hora de incubación, este efecto fue revertido por la adición de insulina+GLP-2. Sin embargo, en la fracción citosólica (**figura 59D**), la insulina solo incrementó la expresión a las 24 horas de incubación y también fue revertido por el tratamiento con insulina+GLP-2.

Como se observa en la **figura 60**, la expresión del ARNm/GCs- $\beta 1$ fue, salvo a las 16 horas de incubación, reducida por el GLP-2. Por el contrario, la insulina aumentó la expresión de forma dependiente del tiempo de incubación y el tratamiento con insulina+GLP-2 anuló completamente los efectos obtenidos con la insulina.

En la fracción celular total, la expresión de la GCs- $\beta 1$ fue incrementada en las células incubadas con GLP-2 durante 1 y 4 horas (**figura 61A**) y en la fracción citosólica, también a las

24 horas (**figura 61B**). La insulina, excepto a las 16 horas, también incrementó la expresión de la GCs $\beta 1$ en la fracción total y la adición de insulina+GLP-2 inhibió los efectos inducidos por esta hormona (**figura 61C**). En la fracción citosólica, la insulina disminuyó la expresión a las 24 horas de incubación, que fue aún menor en presencia de insulina+GLP-2 (**figura 61D**).

La expresión del ARNm/GCs- $\alpha 2$ inducida por GLP-2 mostró un carácter bifásico, siendo menor que la de los controles a 1 y 16 horas de incubación y mayor a las 4 y 24 horas (**figura 62**). En presencia de insulina, el contenido de ARNm/GCs- $\alpha 2$ fue muy superior a la de los controles, salvo a las 4 horas en que fue significativamente inferior. La adición de insulina+GLP-2 produjo el mismo efecto que la insulina a los dos tiempos más cortos, pero bloqueó completamente la expresión a las 16 y 24 horas de incubación.

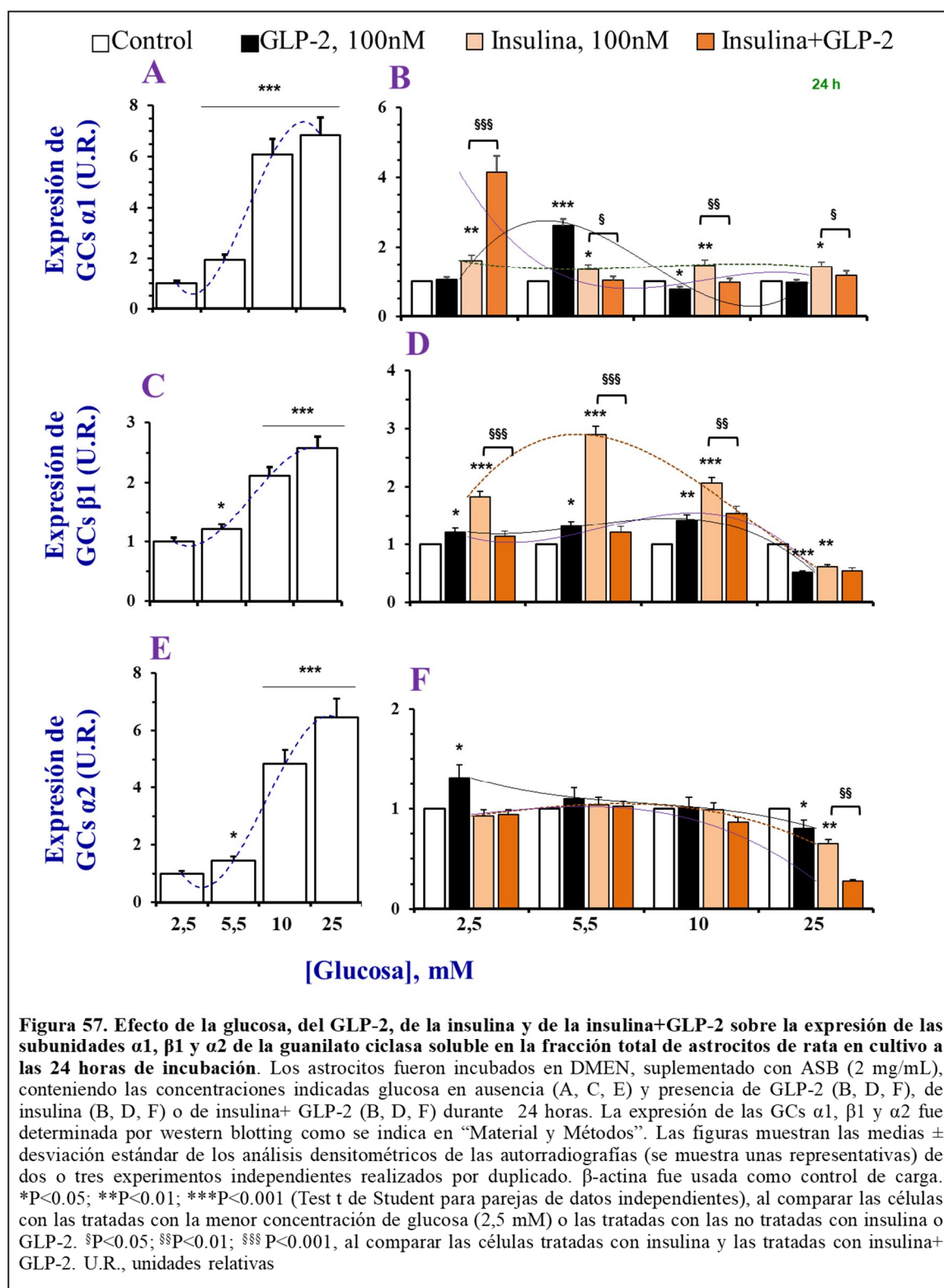
La **figura 63A** muestra que el EGF redujo significativamente la expresión del ARNm/GCs- $\alpha 1$ a 1 y 4 horas de incubación y la aumentó a las 16 y 24 horas, mientras que la adición de EGF+GLP-2 produjo efectos opuestos a los del EGF a todos los tiempos. La expresión de la GCs- $\alpha 1$ en la fracción soluble inducida por EGF guardó cierta similitud con la expresión del ARNm (**figura 63B**), disminuyendo en las células incubadas durante periodos cortos y aumentando en aquellas incubadas durante los tiempos más largos. El tratamiento con EGF+GLP-2 durante 1 hora produjo un significativo incremento de la expresión de la GCs- $\alpha 1$, comparada con las células incubadas con EGF solo, pero a los demás tiempos la expresión fue siempre menor.

Contrariamente a lo observado para la subunidad $\alpha 1$, los resultados obtenidos a nivel de proteína y de ARNm para la subunidad $\beta 1$ no fueron concordantes. El tratamiento con EGF o con EGF+GLP-2 durante 1 y 16 no produjo efecto sobre la expresión del ARNm/GCs- $\beta 1$ (**figura 63C**). Sin embargo, a las 4 y 24 horas de incubación, el EGF redujo significativamente la expresión, siendo comparativamente con estas aún más reducida en las células tratadas con EGF+GLP-2 durante 4 horas y más elevada en las estimuladas durante 24

horas. Por el contrario, la expresión de la GCs- β 1 en la fracción citosólica fue incrementada por el EGF en todos los tiempos ensayados (**figura 63D**) y la adición de EGF+GLP-2 produjo un nuevo incremento de la expresión, salvo a las 24 horas de incubación que fue significativamente menor.

La expresión del ARNm de la GCs- α 2 inducida por EGF siguió un comportamiento bifásico dependiente del tiempo de incubación (**figura 63E**), siendo menor que en los controles cuando las células se incubaron durante 1 y 16 horas y mayor en las incubadas durante 4 y 24 horas. El tratamiento con EGF+GLP-2 siguió un comportamiento parabólico y solo en la primera hora de incubación la expresión del ARNm superó a la obtenida con EGF.

La incubación de los astrocitos mantenidos en un medio de cultivo conteniendo 5,5 mM de glucosa con forskolina durante 1 hora incrementó la expresión del ARNm/GCs- α 1 (**figura 64A**), pero la disminuyó a mayores tiempos de incubación. El tratamiento con forskolina+GLP-2 produjo diferentes efectos, dependiendo del tiempo de incubación. Por otra parte, la expresión del ARNm/GCs- β 1 (**figura 64B**) fue incrementada en las células tratadas con forskolina durante 1 y 4 horas y reducida en las tratadas durante 16 y 24 horas. El tratamiento con forskolina+GLP-2 redujo el efecto de la forskolina a tiempos cortos y lo incrementó a tiempos largos. Finalmente, la expresión del ARNm/GCs- α 2 (**figura 64C**) en las células tratadas con forskolina durante 1 hora fue muy superior a la de los controles y significativamente menor en la incubadas durante periodos más largos. La simultanea adición de GLP-2 redujo el efecto de la forskolina en la primera hora de tratamiento y la aumentó en las incubaciones más largas.



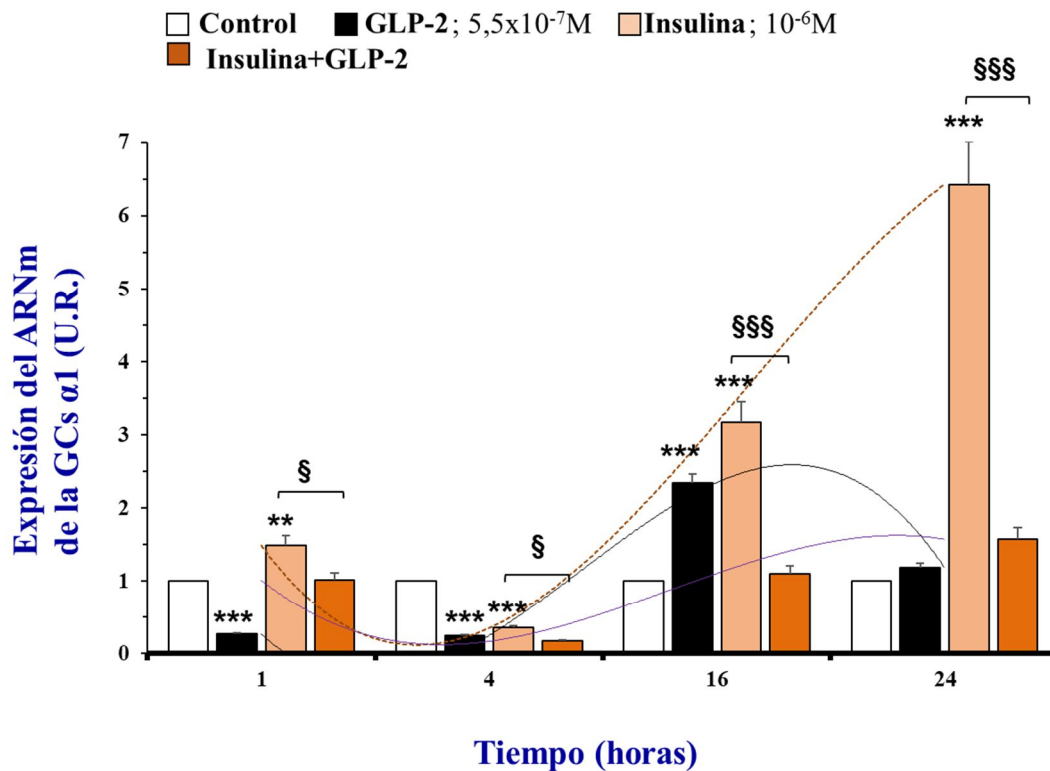


Figura 58. Curso temporal del efecto del GLP-2, de la insulina y de la insulina+GLP-2 sobre la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 1$ de la guanilato ciclasa soluble de astrocitos de rata en cultivo en presencia de 5,5 mM de glucosa. Los astrocitos fueron incubados en DMEN, conteniendo 5,5 mM de glucosa y suplementado con ASB (2 mg/mL), con GLP-2, insulina o con insulina+GLP-2 durante los tiempos indicados. La expresión del ARNm de la GCs $\alpha 1$ fue determinada por RT-PCR como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. § $P < 0.05$; \$\$\$ $P < 0.001$, al comparar las células tratadas con insulina y las tratadas con insulina+ GLP-2. U.R., unidades relativas



Figura 59. Curso temporal del efecto del GLP-2, de la insulina y de la insulina+GLP-2 sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la guanilato ciclasa soluble en la fracción total y citosólica de astrocitos de rata en cultivo en presencia de 5,5 mM de glucosa. Los astrocitos fueron incubados en DMEN, conteniendo 5,5 mM de glucosa y suplementado con ASB (2 mg/mL), con GLP-2 (A, B), insulina (C, D) o con insulina+GLP-2 (C, D) durante los tiempos indicados. Las fracciones total y citosólica fueron obtenidas como se indica en “Material y Métodos”. Asimismo, la expresión de la GCs $\alpha 1$ fue determinada por western blotting como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de los análisis densitométricos de las autorradiografías (se muestra unas representativas) de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. β -actina fue usada como control de carga. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas/parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. $^{\S}P < 0.05$ $^{\S\S}P < 0.01$; $^{\S\S\S}P < 0.001$, al comparar las células tratadas con insulina y las tratadas con insulina+ GLP-2. U.R., unidades relativas

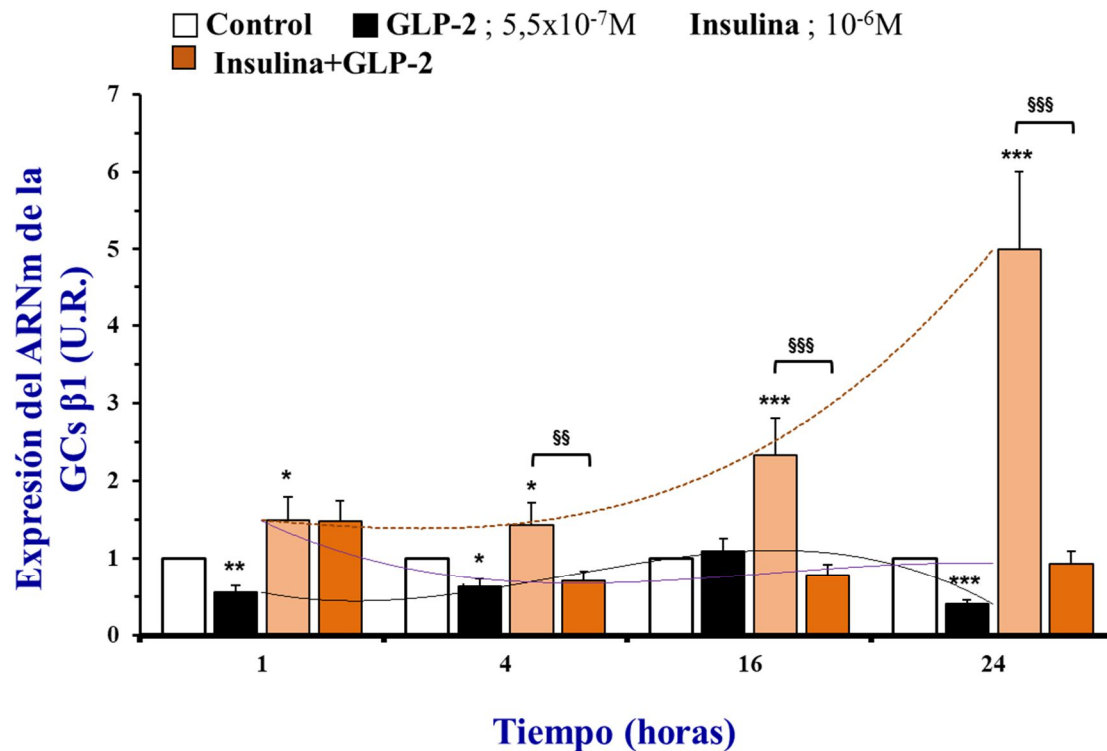
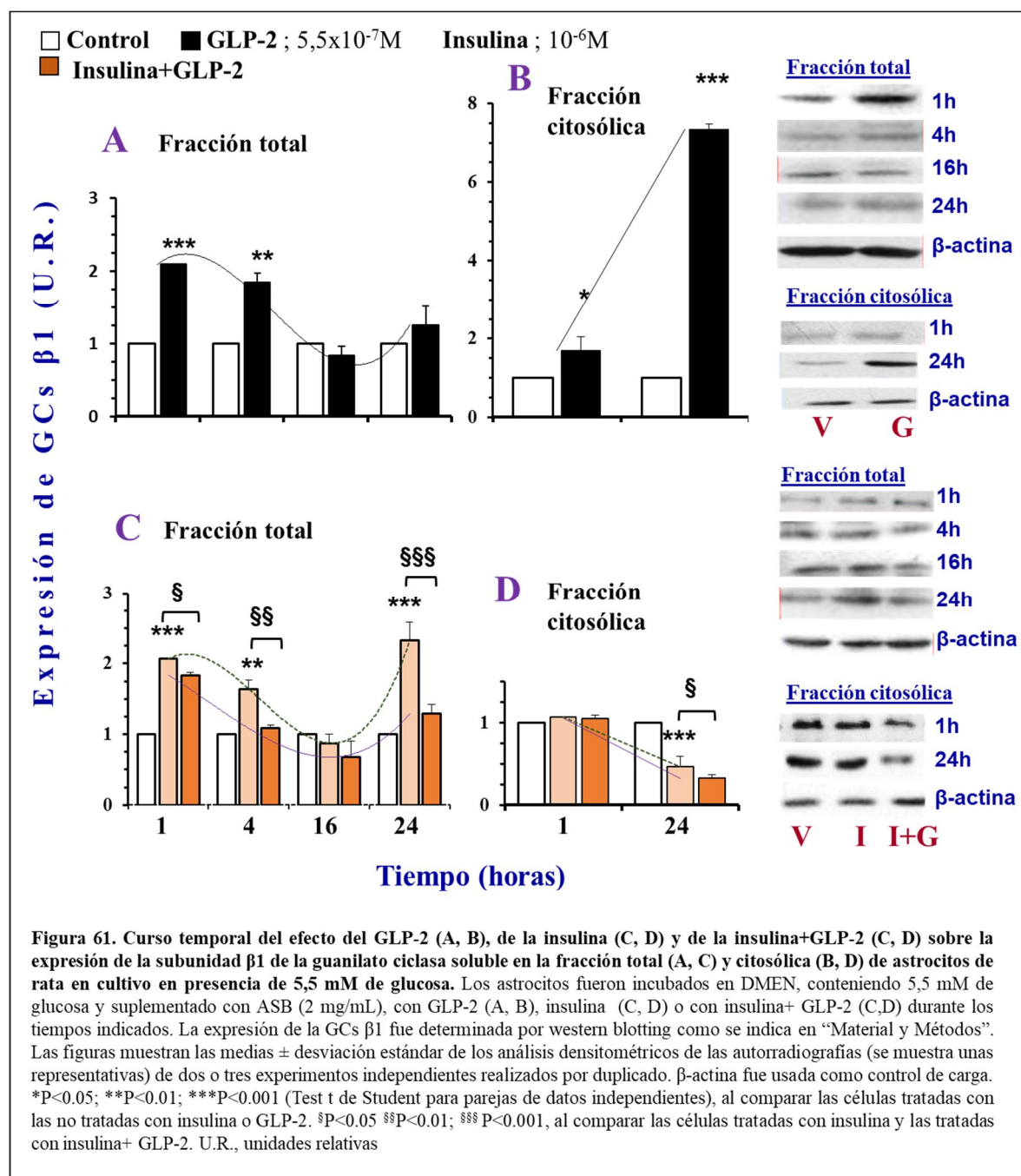


Figura 60. Curso temporal del efecto del GLP-2, de la insulina y de la insulina+GLP-2 sobre la expresión del ARNm de la subunidad $\beta 1$ de la guanilato ciclasa soluble de astrocitos de rata en cultivo en presencia de 5,5 mM de glucosa. Los astrocitos fueron incubados en DMEN, conteniendo 5,5 mM de glucosa y suplementado con ASB (2 mg/mL), con GLP-2, insulina o con insulina+ GLP-2 durante los tiempos indicados. La expresión del ARNm de la GCs $\beta 1$ fue determinada por RT-PCR como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. §§ $P < 0.01$; §§§ $P < 0.001$, al comparar las células tratadas con insulina y las tratadas con insulina+ GLP-2. U.R., unidades relativas



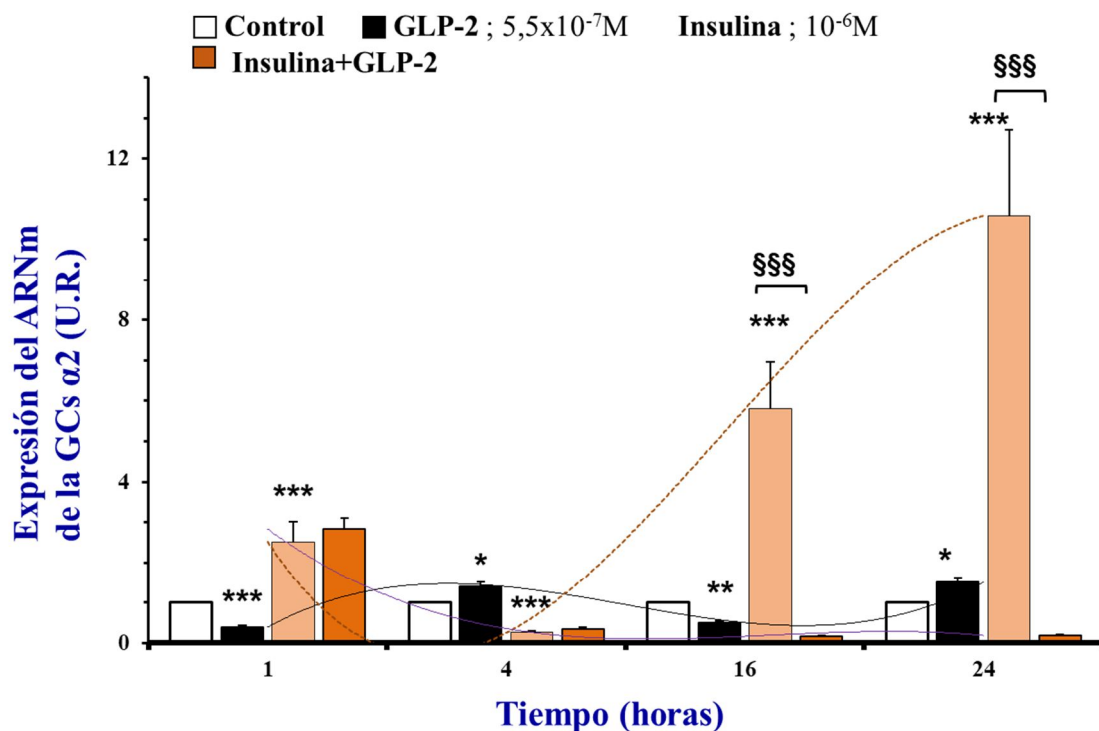
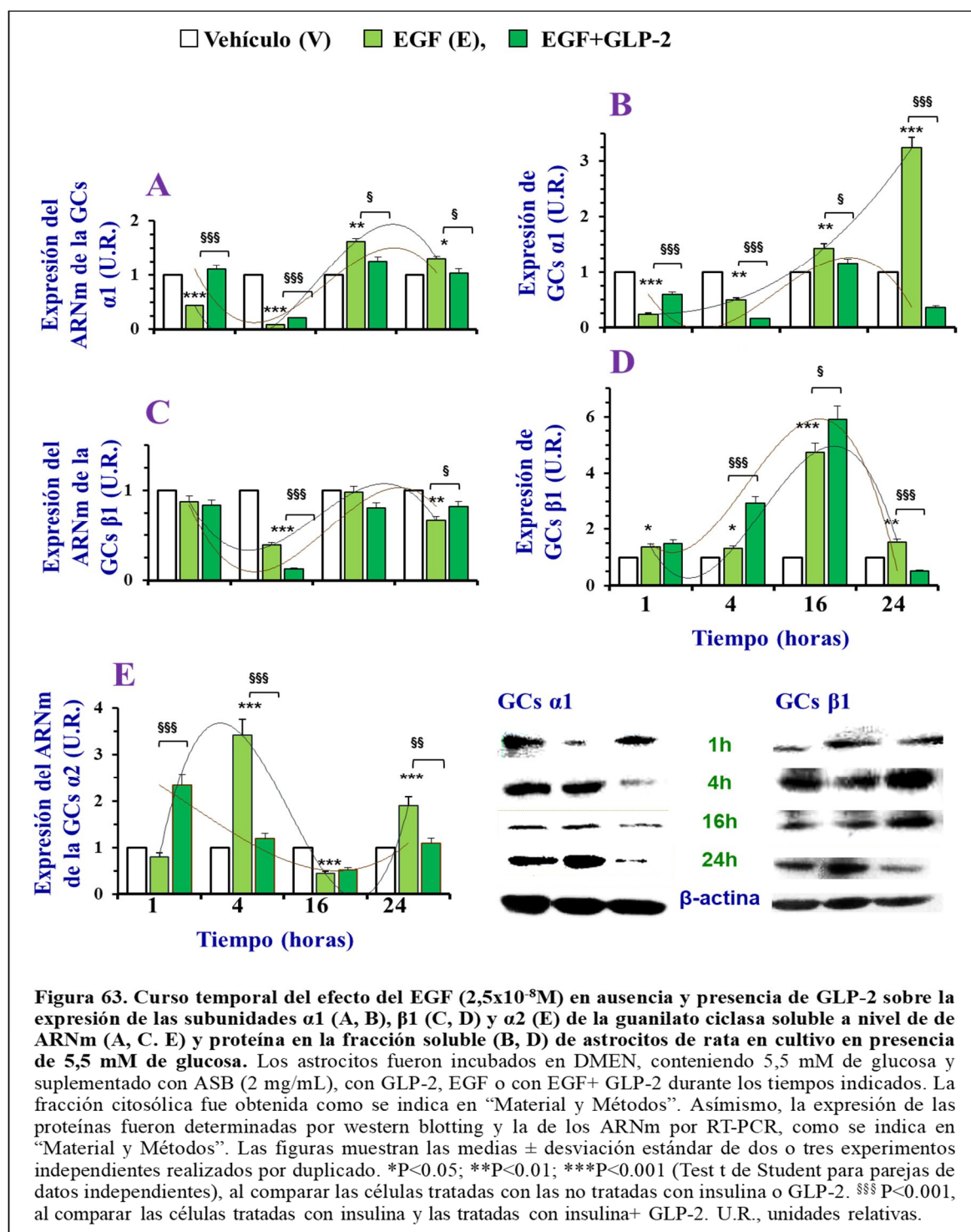


Figura 62. Curso temporal del efecto del GLP-2, de la insulina y de la insulina+GLP-2 sobre la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 2$ de la guanilato ciclasa soluble de astrocitos de rata en cultivo en presencia de 5,5 mM de glucosa. Los astrocitos fueron incubados en DMEN, conteniendo 5,5 mM de glucosa y suplementado con ASB (2 mg/mL), con GLP-2, insulina o con insulina+ GLP-2 durante los tiempos indicados. La expresión del ARNm de la GCs $\alpha 2$ fue determinada por RT-PCR como se indica en “Material y Métodos”. Las figuras muestran las medias \pm desviación estándar de dos o tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Test t de Student para parejas de datos independientes), al comparar las células tratadas con las no tratadas con insulina o GLP-2. §§§ $P < 0.001$, al comparar las células tratadas con insulina y las tratadas con insulina+ GLP-2. U.R., unidades relativas



DISCUSIÓN

Los astrocitos son probablemente la clase más importante de células gliales, pero no solo por su número, que puede llegar a representar la mitad de las células del cerebro, sino, especialmente, por la cantidad, complejidad e importancia de sus funciones. Los astrocitos regulan el procesamiento de la información sináptica, la plasticidad y la excitabilidad neuronal; el sistema de neurotransmisores y la homeostasis iónica. También dirigen la migración neuronal. Regulan el metabolismo energético, sirviendo de soporte metabólico a las neuronas. Además, contienen los mecanismos de destoxificación, de defensa contra el estrés oxidativo y de secuestro de metales. Asimismo, regulan el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y la función inmune¹⁶³.

Por ello, el normal funcionamiento del sincitio que constituye la red astrogial es absolutamente necesario para mantener en buen estado la actividad cerebral. Además, las situaciones fisiopatológicas que alteran el equilibrio dinámico de este conjunto de células no solo afecta a la función de este órgano, sino también al individuo en su conjunto.

Precisamente, debido a la creciente importancia que están adquiriendo los astrocitos en los estudios funcionales de diversas áreas cerebrales, este trabajo ha sido íntegramente realizado en cultivos primarios de este tipo celular, obtenidos a partir de corteza de neonatos de rata y que fueron, morfológica e inmunológicamente caracterizados como astrocitos de tipo I.

1. LA GLUCOSA INDUCE LA PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS

En general, los estudios previos del efecto de la glucosa sobre la proliferación de los astrocitos se han limitado a comparar dos concentraciones extremas, a veces denominadas como baja y alta glucosa y se ha descrito que aquellos que presentaban una capacidad disminuida de capturar glucosa, también mostraron una menor respuesta proliferadora¹⁷⁹. Asimismo, se ha descrito que los cambios bruscos en las concentraciones de glucosa del

medio pueden causar múltiples daños celulares y, en consecuencia, ser responsables de la inhibición de la proliferación de los astrocitos¹⁶⁴.

Por ello, el primer objetivo del presente trabajo fue determinar si las condiciones de crecimiento/mantenimiento de los cultivos primarios (5,5 mM de glucosa) y la variación de la concentración de glucosa en el medio de estimulación (1,4-25 mM), después de un periodo (1-2 horas) de privación total de la hexosa podrían tener algún efecto sobre la proliferación de los astrocitos.

En nuestras condiciones, el incremento en el número de células se apreció incluso a la mayor concentración de glucosa ensayada. Estos resultados concuerdan con los de Kelleher et al.¹⁸⁰, aunque sus estudios fueron realizados en anaerobiosis.

2. EL GLP-2 INCREMENTA LA PROLIFERACIÓN DE LOS ASTROCITOS A ELEVADAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

Nuestro grupo había descrito previamente que el GLP-2 inducía la proliferación de los astrocitos de rata en cultivo¹⁷³ y que este péptido presentaba efectos sinérgicos sobre la proliferación inducida por suero, EGF, PDGF, IGF-1, o por insulina¹⁷⁴. Estos estudios se realizaron en células crecidas, mantenidas y estimuladas en medio DMEN/F-12, cuya concentración de glucosa es de 17,5 mM. Por ello, se estudió el efecto del GLP-2 sobre los astrocitos en presencia de un amplio rango de concentraciones de glucosa (**figura 13**). Curiosamente, el efecto del GLP-2 solo se observó en presencia de altas concentraciones de glucosa, incrementando la proliferación cuando las células se incubaron con 12-20 mM. Con 25 mM de glucosa, el GLP-2 indujo mortalidad, probablemente por superar la capacidad de la placa de cultivo. Este comportamiento de los astrocitos, en respuesta a la presencia de otros mitógenos ya ha sido descrita anteriormente por nuestro grupo¹⁷⁵.

3. EL GLP-2 EJERCE SUS ACCIONES BIOLÓGICAS A TRAVÉS DE SU PROPIO RECEPTOR

Se ha descrito que para atenuar la atrofia de la mucosa intestinal en ratones con alimentación parenteral total, el GLP-2 no ejerce sus efectos a través de su propio receptor, sino mediante el receptor funcional de EGF¹⁸¹. Por otro lado, se ha descrito que el efecto estimulador de la glucosa sobre la proliferación de las líneas celulares BxPC-3 y Panc-1 (de cáncer de páncreas humano) es mediado por la inducción de la expresión de EGF y la transactivación del EGFR¹⁸² y que la expresión del EGFR está disminuida en los astrocitos incapaces de capturar glucosa y, en consecuencia, tienen disminuida su capacidad de proliferación¹⁷⁹. Por otra parte, la posible existencia en astrocitos de un control recíproco entre GLP-2 e IGF-1 y sus respectivos receptores ya había sido descrito por nuestro grupo¹⁷⁴.

Puesto que los astrocitos también presentan receptores para GLP-1 (GLP-1R)¹⁸³ y dada la elevada homología que existe con el GLP-2R⁸⁰, además de la que presentan los respectivos ligandos, en este trabajo hemos diseñado experimentos destinados a evaluar si el GLP-2 actuaba a través de su propio receptor y compararlos con los efectos biológicos del GLP-1 en los astrocitos (**figuras 14-16**). Efectivamente, los resultados de la incorporación de [³H]-timidina al ADN, de la cuantificación del número de células y de la producción de AMPc así lo indican. Asimismo, los resultados aquí presentados confirman otros previos de nuestro grupo demostrando que la exendina (9-39) también es un antagonista del GLP-2R¹²⁸.

4. LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL GLP-2R EN LOS ASTROCITOS PUEDE SER REGULADA POR GLUCOSA Y OTROS FACTORES

Puesto que los efectos biológicos del GLP-2 en los astrocitos de rata en cultivo fueron mediados a través de su propio receptor, en esta tesis se ha estudiado si determinadas condiciones experimentales podrían modular la expresión del ARN mensajero del GLP-2R.

Se ha demostrado que la expresión disminuye con la edad del subcultivo, siendo mínima cuando la capacidad de proliferación celular está muy disminuida (**figura 17**). Dado que no hay datos conocidos sobre la expresión del GLP-2R en células aisladas, nuestros resultados solo pueden compararse con los obtenidos *in vivo*. Así, en cerdo y rata, los niveles del ARNm/GLP-2R fueron comparativamente más altos en el intestino fetal y neonatal que en el adulto^{184,185}.

Previamente, nuestro grupo había descrito que el suero desnaturalizado incrementaba la transcripción del gen de este receptor, presentando efectos máximos dependientes de tiempo y de concentración¹⁷⁴. En esta tesis se describe por primera vez que la glucosa regula la expresión del ARNm/GLP-2R y que, a las 4 horas de incubación, los valores máximos se obtuvieron con 17,5 mM de glucosa (**figura 18A**). No tenemos una explicación consistente para este hecho, salvo que el número de receptores de GLP-2, además de estar implicados en los procesos de estimulación de la proliferación, de la inhibición de la apoptosis y en las fases S y G2-M del ciclo celular de los astrocitos¹⁷³, estén envueltos en otros procesos aun no bien conocidos.

Además, se estudiaron los efectos directos del tratamiento de los astrocitos con GLP-2 sobre la expresión del ARNm/GLP-2R (**figura 18A**). Los resultados fueron diferentes (aumentando, disminuyendo o sin efecto) dependiendo de la concentración de glucosa en el medio y del tiempo de incubación (**figura 18B**). Una respuesta en parte equiparable (diferencias en función del tiempo de incubación y la concentración de SBF desnaturalizado) había sido observada previamente en estas mismas células¹⁷⁴. Más estudios serán necesarios realizar para determinar el principal papel de los GLP-2R en los astrocitos.

Por otra parte, se ha descrito el efecto de nutrientes que incrementan los niveles plasmáticos de GLP-2 sobre la expresión del GLP-2R. Los resultados han sido contradictorios, pues mientras la dieta con alto contenido en grasas incrementó la expresión

del receptor en el intestino de ratón⁷⁶, la alimentación enteral produjo una disminución de la expresión del ARNm/GLP-2R en el intestino delgado de cerdos durante el desarrollo¹⁸⁶ y la dieta suplementada con peptina no modificó los niveles del ARNm/GLP-2R en el intestino delgado de rata¹⁸⁷.

En estudios con modelos animales también se ha descrito este contradictorio comportamiento. En cerdos hembras de 21 días de edad, la administración intraperitoneal de GLP-2 produjo una disminución de la expresión del ARNm del GLP-2R y del número de células GLP-2R positivas en el íleon¹⁸⁸, el GLP-2 también disminuyó la expresión del ARNm/GLP-2R en el yeyuno de ratas con el síndrome de intestino corto, pero no en ratas con resección del intestino distal⁴⁷. Por el contrario, el tratamiento con un inhibidor de la DPP incrementó la expresión del GLP-2R en las células de las criptas de ratones con síndrome de intestino corto²⁷.

Aunque una relación recíproca entre el IGF-1, el GLP-2 y sus respectivos receptores ha sido previamente descrita en astrocitos incubados con suero desnaturalizado¹⁷⁴, en general, la regulación de la expresión del GLP-2R sigue siendo muy poco conocida. En el íleon de cerdos tratados con LPS se ha descrito un ligero aumento de la expresión del GLP-2R que fue revertida hasta el nivel de los animales control tras la administración de GLP-2³⁴.

En esta tesis se han abordado, por primera vez, el estudio de los efectos de ciertos factores de crecimiento (IGF-1, PDGF, IGF-2, NGF, EGF), hormonas (insulina, leptina) y neuropéptidos (NPY), sobre la expresión del ARNm/GLP-2R en los astrocitos (figuras 20-22). Las condiciones experimentales fueron diferentes en cuanto al tiempo de estimulación, la concentración de glucosa y la presencia de GLP-2. Los resultados más llamativos fueron los siguientes: a) IGF-1, NGF, Leptina y NPY inhibieron la expresión a tiempos cortos; b) PDGF disminuyó la expresión a tiempos largos; c) PDGF e IGF-2 incrementaron la expresión

a tiempos cortos; d) ausencia de efectos de la insulina y del EGF; e) GLP-2 incrementó la expresión de las células tratadas con PDGF y NGF.

5. LA GLUCOSA MODIFICA LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS IMPLICADAS EN LA PROLIFERACIÓN, LA SUPERVIVENCIA Y LA DIFERENCIACIÓN CELULARES. EFECTOS DE LA INSULINA Y DEL GLP-2

Puesto que tanto la densidad celular como la expresión del ARNm del GLP-2R fueron dosis-dependientemente incrementados por glucosa, los efectos de este azúcar sobre la expresión de pKi-67, PCNA, c-FOS y GFAP fueron estudiados (**figuras 23-28**). Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión fueron dependientes de la concentración de glucosa y/o del tiempo de incubación, y podrían estar de acuerdo con otros, también obtenidos en cultivos primarios de astrocitos de rata, en los que la proliferación, medida por la expresión de pKi-67, disminuyó al privar las células de oxígeno y glucosa¹⁹⁰ y, en parte, con aquellos en los que la inyección aguda de glucosa indujo la activación de los astrocitos del núcleo arcuato de rata y la expresión de c-FOS y GFAP¹⁹¹.

Se ha descrito que la insulina incrementa de manera dosis-dependiente la proliferación de los astrocitos humanos¹⁹². Por ello, dado que la insulina no modificó la expresión del ARNm del GLP-2R en nuestras células, los efectos de esta hormona sobre los marcadores indicados también fueron estudiados. En determinadas condiciones experimentales, la insulina incrementó la expresión de pKi-67 y PCNA. Estos resultados son comparables con los obtenidos en el hipocampo de ratas diabéticas, en donde la expresión de las células pKi-67 positivas fue mayor que en las controles¹⁹³.

Se ha descrito previamente que los niveles de GFAP en los astrocitos del núcleo arcuato del hipotálamo de ratas diabéticas disminuyeron en la misma proporción que lo hizo el número de células¹⁹⁴; también que la insulina (añadida junto a otros mitógenos) incrementó

la expresión de GFAP¹⁹⁵ y de c-FOS¹⁷⁵ en los astrocitos. Sin embargo, en las condiciones experimentales de la presente tesis, la insulina solo alteró ligeramente la expresión de c-FOS (**figura 26**) y no modificó la de GFAP (**figura 28**).

Con anterioridad nuestro grupo¹⁷⁴ había descrito que el GLP-2 incrementaba la expresión de PCNA, c-FOS y GFAP en los cultivos primarios de astrocitos en presencia de alta glucosa (17,5 mM) y suero desnaturalizado. Sin embargo, en las específicas condiciones experimentales de la presente tesis (**figuras 25-28**), los efectos del GLP-2 sobre la expresión de PCNA, c-FOS y GFAP fueron poco significativos. No obstante, experimentos valorando la expresión de c-FOS fosforilado podrían ser de gran interés para conocer mejor el efecto del GLP-2 sobre la proliferación de los astrocitos.

6. PAPEL DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, COACTIVADORES Y SENSORES METABÓLICOS

En respuesta a los mitógenos, la fase G2 del ciclo celular se caracteriza por un incremento del metabolismo general, lo que permite producir la cantidad de moléculas necesarias para el desarrollo de las dos células hijas. Puesto que el medio de cultivo dispone de los sillares moleculares fundamentales para su síntesis, los astrocitos deben obtener la energía necesaria para tal fin de la degradación de la glucosa. Efectivamente, baja concentración de glucosa puede causar la parada del ciclo celular en la fase G1¹⁹⁶. Por el contrario, el incremento del metabolismo de la glucosa ha mostrado ser esencial para la puesta en marcha de la maquinaria molecular que induce la proliferación de los astrocitos¹⁹⁷.

El incremento del metabolismo de la glucosa en los astrocitos es rápidamente inducido por la insulina y el IGF-1. Sin embargo, puesto que la cantidad de glucosa utilizada por estas células en los procesos celulares dependientes de energía, que son inducidos por la

insulina, es mayor que la cantidad capturada, el contenido neto de glucosa en su interior disminuye también rápidamente¹⁹⁸.

Aunque *in vivo* el ATP generado por los astrocitos a partir de la glucosa proviene casi exclusivamente de la glucólisis¹⁹⁹ (el lactato liberado será usado por las neuronas durante la respiración celular), en los experimentos que aquí se describen, cultivos prácticamente puros de astrocitos, probablemente altas concentraciones extracelulares de lactato podrían condicionar, al menos en parte, la fisiología celular²⁰⁰. Además, se ha descrito que, independientemente de la concentración de glucosa en el medio, la insulina no afecta a la secreción de lactato en los astrocitos humanos¹⁹², por lo que quizás fuera necesaria la presencia de neuronas para determinar el papel de la insulina sobre la secreción de lactato en estas células¹⁹².

Por otra parte, también se ha descrito que los astrocitos sintetizan los lípidos que utilizan las neuronas para la formación y función de las sinapsis²⁰¹. Puesto que el GLP-2 también puede ser considerado como un mitógeno que induce la puesta en marcha del ciclo celular en los astrocitos¹⁷³, un objetivo de esta tesis ha sido estudiar los efectos de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos, incluyendo factores y coactivadores de la transcripción, sensores y reguladores metabólicos.

La familia de factores de transcripción SREBP (SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2), implicados en el control de la expresión de las enzimas clave de la síntesis de lípidos, están presentes en los astrocitos, pero no en las neuronas²⁰¹. La expresión de SREBP-1c es inducida por insulina, glucosa y ácidos grasos en diversos tipos celulares y se altera en ciertas condiciones fisiopatológicas como la diabetes y los trastornos nutricionales²⁰². Nuestros resultados indican que la glucosa (a elevadas concentraciones) y la insulina (a bajas concentraciones de glucosa), pero no el GLP-2, incrementaron la expresión de SREBP-1c en

los astrocitos de corteza de rata en cultivo a las 24 horas de incubación (figura 29). En hígado, la fosforilación dependiente de AMPK inhibe la formación de la SREBP-1c activa y, por tanto, la expresión de sus genes diana, disminuyendo la lipogénesis y la acumulación de lípidos inducida por altas concentraciones de glucosa²⁰³; la expresión de tales genes también es inhibida por la fosforilación dependiente de GSK3 que induce la proteólisis del factor de transcripción activo en situaciones de ayuno prolongado o deficiencia de insulina²⁰⁴; asimismo, se ha descrito que la fosforilación dependiente de ciertos miembros de la familia de las MAPKs también produce alteraciones en el metabolismo de lípidos²⁰⁵.

PGC-1 (PGC-1 α y PGC1 β) son una familia de coactivadores transcripcionales que median las señales nutricionales y hormonales con el metabolismo energético²⁰⁶, incluyendo el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos²⁰⁷. La señalización mediada por PGC-1 α es inducida por AMPK y en los astrocitos la acción coordinada de ambos regula las respuestas frente a los daños metabólico y oxidativo²⁰⁸. Nuestros resultados muestran que las más elevadas concentraciones de glucosa aumentan la expresión de PGC-1 α de los astrocitos, mientras que la insulina lo hace a bajas concentraciones de glucosa y el GLP-2 solo en normoglucemia (**figura 30**).

AMPK es un sensor que detecta el estrés metabólico y mantiene la homeostasis celular^{209,210}. Es una proteína heterotrimérica constituida por una subunidad catalítica y dos subunidades reguladoras. La actividad de la AMPK depende de la unión antagónica de los nucleótidos AMP y ATP a sendos sitios en la subunidad γ reguladora. La unión de AMP activa las rutas catabólicas productoras de ATP (captura de glucosa, glicolisis, oxidación de ácidos grasos, biogénesis mitocondrial), mientras inhibe las rutas biosintéticas (gluco- y glucogenogénesis, síntesis de ácidos grasos y de colesterol y proteinogénesis) y otros procesos consumidores de energía, incluyendo la proliferación celular^{211,212}. En nuestras células, la máxima expresión de la AMPK, a las 24 horas de incubación, se obtuvo con las

más elevadas concentraciones de glucosa (**figura 38A**). La insulina produjo un incremento adicional solo a bajas concentraciones de glucosa, mientras que el GLP-2 incrementó la expresión de las células incubadas con las más elevadas concentraciones de glucosa (**figura 38B**).

A la vista de los resultados obtenidos, todo parece indicar que, a las 24 horas de incubación, la expresión de SREBP-1c, PGC-1 α y AMPK sigue un patrón común en los astrocitos, que podría considerarse dependiente de la concentración de glucosa. Asimismo, este nivel “basal” de expresión parece ser “compensado” por la presencia de insulina, pero no por la de GLP-2. Esta elevación de la expresión dependiente de glucosa y sostenida a largo plazo podría indicar lo siguiente: a las 24 horas, los astrocitos han entrado en la fase G2 del ciclo celular¹⁷³, por lo que hay una elevada concentración de enzimas (dianas directas de SREBP-1c e indirectas de PGC-1 α) responsables de la síntesis de los lípidos de membrana y de otros componentes celulares, a partir de la glucosa del medio, necesarios para la división celular. En este tiempo, elevados niveles de AMPK podrían actuar de inductores de proliferación, ya que como se ha descrito en glioblastomas humanos, la activación continuada de la AMPK no parece estar restringida a la producción del ATP necesario para mantener la elevada tasa de división celular, sino que también está implicada en el control de la proliferación²¹³.

PASK (Per-Arnt-Sim Kinase) es un sensor de nutrientes que parece estar implicado en la regulación del metabolismo de la glucosa y de lípidos²¹⁴. Se ha descrito que su expresión en ciertas áreas hipotalámicas está regulada bajo condiciones de ayuno/realimentación y que podría mediar la señalización del GLP-1, en las que también participa AMPK²¹⁵. Sin embargo, a las 24 horas de incubación, la expresión de PASK en los astrocitos de corteza no fue afectada bajo ninguna de las condiciones experimentales estudiadas (**figuras 39A y B**). Con el fin de determinar si la proteína sintetizada tenía una larga vida media, la expresión de

PASK fue valorada en las células preincubadas con cicloheximida, siendo muy baja o casi indetectable en presencia de las mayores concentraciones de glucosa. Los efectos de la insulina y del GLP-2 sobre la degradación de la PASK fueron dependientes de glucosa (**figuras 39C y D**). Nuevos experimentos deben ser diseñados para dar respuesta a estos resultados.

Ha sido mencionado anteriormente el papel de AMPK en el control del metabolismo energético. Por ello, hemos estudiado los niveles de expresión de la proteína total en los astrocitos incubados, durante 2 horas (fase G0/G1 del ciclo celular), con un amplio rango de concentraciones de glucosa. Como cabría esperar, la expresión disminuyó significativamente con el aumento de la glucosa presente en el medio, mientras que la insulina tuvo una influencia menor (**figura 37**). Nuestros resultados parecen indicar que la relación AMP/ATP también podría estar implicada en el control a corto plazo de la expresión de AMPK en los astrocitos.

Para profundizar en esta hipótesis, los astrocitos fueron incubados en medio conteniendo una muy baja concentración de glucosa (0,5 mM) por un periodo de tiempo de hasta 60 minutos. Efectivamente, la expresión aumentó linealmente con el tiempo de incubación. La insulina (no el GLP-2) produjo un incremento adicional solo en los primeros 15 minutos (**figura 36A y B**). Estos resultados sugieren que la insulina estimula la traducción de los ARNm previamente formados.

AMPK también se activa por fosforilación de la T-172 de la subunidad α catalítica mediante ciertas AMPKK: LKB1 (Quinasa Hepática B1), CaMKK (Calcio calmodulina-dependente proteína quinasa quinasa) y, probablemente, por TAK1 (factor de crecimiento transformante beta 1), un miembro de la familia MAPKKK (proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos)²¹⁶. La fosforilación y la desfosforilación/inactivación son inducidas por hormonas y otros factores; por ello, estudiamos el curso temporal del efecto de la insulina

(y del GLP2) sobre la expresión de la forma fosforilada de AMPK. Ambos tratamientos produjeron un efecto similar. En los primeros 30 minutos, la proteína presente está desfosforilada y, probablemente, activa por unión del modulador positivo (AMP). Sorprendentemente, a los 60 minutos, en presencia de insulina (y de GLP-2), la forma fosforilada duplicó la de los controles. Probablemente, la señalización de la insulina, incluyendo la activación de fosfatasas, se encuentre alterada en las condiciones celulares de muy baja concentración de glucosa.

7. PAPEL DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ACETIL-COENZIMA A

Además de por la presencia de moduladores alostéricos positivos (citrato) y negativos (palmitoil-CoA), la acetil coenzima A carboxilasa (ACC), enzima responsable de la síntesis de malonil-CoA, es regulada por modificación covalente. La fosforilación dependiente de AMPK induce la inactivación de la ACC²¹⁷. No obstante, el efecto directo de la concentración de glucosa sobre la expresión de la ACC de los astrocitos de corteza es poco conocido. Además, el efecto de la insulina, y aun menos el del GLP-2, bajo estas circunstancias, no ha sido estudiado todavía. En este trabajo, hemos valorado la expresión de la ACC a las 24 horas de incubación y también el grado de fosforilación de la proteína, con el fin de determinar la proporción de la forma inactiva presente. Nuestros resultados muestran que el nivel más bajo de expresión fue obtenido en condiciones de normoglucemia (**figura 35A**). La insulina produjo un incremento adicional de la expresión de la ACC independientemente de la concentración de glucosa (**figura 35B**). Además, la mayor parte de la misma estaba desfosforilada y, por tanto, activa (**figura 23 35C**). En general, el GLP-2 también estimuló en parte la expresión de la forma desfosforilada de la ACC. Estos resultados sugieren que, en

la fase G2 del ciclo celular, la insulina (y probablemente también el GLP-2) están promoviendo la síntesis de ácidos grasos a partir de la glucosa en los astrocitos.

8. PAPEL DE LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES Y ENZIMAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Es ampliamente reconocido que la glucosa es la principal fuente de energía en el cerebro y que los astrocitos cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis energética, en general, y de la glucosa, en particular, dado que estas células son las únicas responsables del metabolismo del glucógeno¹⁹⁸.

Aunque el GLUT-1 parece ser responsable del transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica²¹⁸, recientemente, el estudio en los astrocitos de la expresión de los transportadores de glucosa ha cobrado mucho interés. Como en la mayoría de las áreas y tipos celulares del SNC, en general se asume que GLUT-1 y GLUT-3 son los transportadores de glucosa más abundantes en los astrocitos, mientras que la expresión de GLUT-2 y GLUT-4 es muy baja o, incluso, indetectable^{128,192,198}. No obstante, en relación a la importancia de GLUT-3 en estas células no existe verdadero consenso. Así, mientras en los astrocitos humanos ha sido considerado como el principal transportador de glucosa, que se detecta incluso en condiciones basales¹⁹², en los astrocitos de rata en cultivo está ausente en condiciones normales y solo aumenta su expresión en situaciones de hipoglucemia y deficiencia de oxígeno (circunstancias que concurren en la isquemia cerebral), y en las células tratadas con endotoxinas que elevan la producción de óxido nítrico (NO), confiriéndole un papel neuroprotector al aumento de la captura de glucosa por el GLUT-3²¹⁹. En nuestras condiciones experimentales, la expresión de GLUT-3 no fue detectada (resultados no mostrados).

Se ha descrito que la desnutrición induce el aumento de la expresión de GLUT-1 en corteza cerebral de ratas lactantes²²⁰ y que la inhibición de la comunicación celular entre los astrocitos incrementa el transporte de glucosa a través del aumento de GLUT-1 en la membrana plasmática¹⁹⁷. Sin embargo, el efecto directo de la glucosa sobre la expresión de GLUT-1 en astrocitos aun no ha sido estudiado. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo fue abordar esta cuestión utilizando un amplio rango de concentraciones de glucosa. Variaciones significativas solo fueron determinadas a las 4 horas, en donde los niveles más bajos fueron encontrados en las células incubadas en condiciones de normoglucemia y los mayores niveles de expresión, en los astrocitos incubados con 20 mM de glucosa (**figura 31C**).

Con relación a la insulina nuestros resultados fueron ciertamente interesantes: esta hormona incrementó la expresión de GLUT-1 en las células incubadas con menos cantidad de glucosa a medida que aumentaba el tiempo de incubación (**figuras 31B, D y F**), lo que podría estar relacionado con las necesidades energéticas, de almacenamiento de glucógeno y/o de la síntesis de componentes celulares, en respuesta a la actividad mitogénica de la insulina. No se han descrito resultados con los que poder establecer una comparación. No obstante, se ha descrito que la entrada de glucosa en astrocitos a través de los diferentes GLUTs estudiados no fue afectada por el tratamiento conjunto con insulina e IGF-1, a pesar de que los niveles citosólicos de glucosa disminuyeron significativamente por el aumento del metabolismo de la glucosa, incluyendo la síntesis de glucógeno¹⁹⁸.

El GLUT-2 y la glucoquinasa (GK, hexoquinasa IV), abundantes en hígado y páncreas endocrino²²¹, han sido caracterizados como parte de un sistema sensor de glucosa presente en determinadas áreas hipotalámicas que rigen la ingesta de alimentos²²², en las que también parecen estar involucrados los astrocitos^{162,191}. Sin embargo, no se conoce si este

sistema sensor de glucosa opera también en los astrocitos de la corteza cerebral. Por esta razón, nos pareció interesante su estudio en nuestro modelo de astrocitos en cultivo.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que el sistema GLUT-2/GK se expresa en los astrocitos de corteza cerebral de rata en cultivo. Durante las fases G0/G1 (2 horas) y G2 (24 horas) del ciclo celular, la expresión de GLUT-2 fue mayor en presencia de las más elevadas concentraciones de glucosa (**figuras 32A y C**). Sin embargo, a las 18 horas, durante la fase S del ciclo celular, la expresión de GLUT-2 experimentó una ligera disminución, aunque no significativa (**figura 32E**). El efecto de la insulina fue dependiente del tiempo de exposición y de la concentración de glucosa presente en el medio (**figuras 32B y D**); pero, en cualquier caso, las variaciones en la expresión de GLUT-2 fueron siempre más significativas que las observadas con GLUT-1. Probablemente la glucosa que entra en las células a través del GLUT-2, cuya expresión, a las 24 horas, es precisamente inducida de manera más significativa por la insulina a baja y alta concentración de glucosa, sea destinada a la lucha contra el estrés oxidativo causado por la posible baja producción de ATP¹⁷⁹ o por el cambio brusco de concentración de glucosa en el medio¹⁶⁴. Ambas situaciones podrían activar vías de señalización responsables de la inhibición de la proliferación de los astrocitos.

Ha sido mostrado que la administración exógena de GLP-2⁴⁷ o el tratamiento con un inhibidor de la DPP-IV²⁷ induce la expresión del GLUT-2 en animales con resección intestinal o con el síndrome de intestino corto. Nuestros resultados describen, por primera vez, el efecto directo del GLP-2 sobre la expresión del GLUT-2 en astrocitos de rata en cultivo. A las 18 horas, el incremento de la expresión fue dependiente de la concentración de glucosa y siempre mayor que el inducido por la insulina (**figura 32F**). Además, en presencia de la más alta concentración de glucosa, el efecto del GLP-2 fue dosis-dependiente (**figura 32G**). No sabemos con claridad que pueden significar estos resultados, salvo que las células incubadas con GLP-2, en la fase G2 del ciclo celular mantengan sobreactivada la ruta de las

pentosas que produce el NADPH necesario para la síntesis de lípidos (la ACC está activada, **figura 35**), pero también para restablecer los daños causados por los altos niveles de glucosa¹⁸³. Estudios valorando diversos parámetros implicados en el estrés oxidativo abrirán nuevos caminos en este sentido.

Se ha descrito que la inhibición de la comunicación celular, además de incrementar la captura de glucosa, induce cambios de localización de la hexoquinasa I y el incremento de la expresión de la hexoquinasa II en los astrocitos¹⁹⁷. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que, a las 24 horas de incubación, la expresión de la GK es significativamente menor en presencia de las más altas concentraciones de glucosa (**figura 33A**). Sorprendentemente, la insulina incrementó la expresión de la GK solo en presencia de baja y muy alta concentración de glucosa, mientras que fue significativamente menor que la de los controles en presencia de concentraciones intermedias de glucosa. Por su parte, el GLP-2 elevó la expresión de la GK solo en presencia de concentraciones de glucosa muy elevadas.

Estos resultados reflejan el diverso papel que desempeñan las diferentes hexoquinasas en los astrocitos, probablemente relacionados con los múltiples destinos de la glucosa en estas células y dependiendo de la concentración del azúcar, de la presencia de mitógenos y del tiempo de exposición a los mismos. Nuevos experimentos deberán hacerse para dar respuesta a las múltiples preguntas que surgen a la vista de estos resultados. Algunas de las preguntas solo obtendrán una respuesta más fisiológica cuando esos estudios se realicen en co-cultivos de neuronas y astrocitos¹⁹⁹.

Precísamente, dado que este trabajo se ha realizado con cultivos puros de astrocitos, un incremento de la concentración extracelular de lactato podría promover de nuevo su reentrada y favorecer su oxidación a piruvato y la posterior utilización de este en la mitocondria. En esta situación, debido al efecto Pasteur, se reduciría el consumo de glucosa. Pero, además, la competencia de la LDH y la GADPH por el NAD^+ citosólico, podría llegar

a bloquear completamente la glucólisis. De hecho, muchos procesos celulares que ocurren en los astrocitos son dependientes de la relación NAD^+/NADH (en equilibrio con la relación lactato/piruvato), y esta, a su vez, de la disponibilidad de sustratos energéticos¹⁵⁹. Por ello, la expresión de la GADPH fue estudiada a las 24 horas de incubación. Nuestros resultados así lo sugieren, ya que el ligero aumento de la expresión de la GAPDH, observado en las células incubadas con 25 mM de glucosa, fue significativamente disminuido en las células tratadas con insulina (**figura 34**).

Nuestros resultados en su conjunto podrían parcialmente explicarse de la siguiente manera: la insulina produjo la activación de todas las rutas metabólicas de la glucosa, incluyendo la glucólisis y la glucogenogénesis. Debido a la gran cantidad de glucosa presente, los almacenes de glucógeno se llenaron pronto. Dado que no existen neuronas capaces de retirar la gran cantidad de lactato producido, este podría entrar de nuevo en la célula y reconvertirse en piruvato, generando NADH citosólico que solo podría ser reoxidado a NAD^+ después de transferir sus electrones a la cadena de transporte electrónico y, mediante la fosforilación oxidativa, se obtendría ATP. El piruvato se metabolizaría en la mitocondria, produciendo acetil-CoA y más NADH. El NADH daría lugar a más ATP. El acetil-CoA podría degradarse en el ciclo de Krebs y en consecuencia generar más ATP. El incremento de ATP terminaría por inhibir el ciclo de Krebs y entonces el exceso de acetil-CoA, sustrato de la ACC (**figura 35**), sería desviado para la síntesis de lípidos. Para ello, se necesitaría NADPH. El exceso de G6P, como consecuencia de la mayor expresión de la GK (**figura 33**), se desviaría hacia la ruta de las pentosas, vía mayoritaria de la producción de NADPH. La velocidad de la glucólisis disminuiría, y con ello la cantidad de GADPH (**figura 34**), hasta el nivel necesario para mantener la homeostasis energética.

9. LA GLUCOSA, EL GLP-2 Y LA INSULINA ACTÚAN A TRAVÉS DE DIVERSAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES

Nuestros resultados parecen indicar que la glucosa, en los astrocitos de rata en cultivo, además de ser un metabolito energético y precursor de diversos componentes celulares, podría ser un regulador fundamental de procesos tan importantes como la proliferación. Esto supondría que la glucosa sería capaz de estimular alguna de las cascadas de transducción de señales que activan el crecimiento celular. Este tipo de estudios se ha realizado principalmente en células cancerosas. Así, en células de cáncer de endometrio, la glucosa moduló diversas vías de señalización, incluyendo AMPK, mTOR/S6 y MAPK¹⁹⁶; en ciertas líneas celulares de cáncer de páncreas humano, la proliferación dependiente de glucosa fue mediada por la inducción de la expresión de EGF y la transactivación de EGF-R¹⁸².

En las células gliales, los estudios se han centrado fundamentalmente en determinar los efectos de la hipoxia y/o la falta de glucosa, en donde se ha descrito: la disminución de la expresión de EGF y la inactivación de la Akt, pero principalmente la activación de vías que inducen aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno, inhibición de la proliferación, apoptosis, etc¹⁷⁹. Asimismo, el tratamiento con LPS+ IFN- γ produce en los astrocitos efectos similares a la privación de glucosa: aumento de los niveles de NO y peroxinitrito, pérdida de producción de ATP y finalmente, muerte celular. Efectos mediados por una sostenida activación de la ERK1/2²²³. Estos estudios están dirigidos a mejorar el grave pronóstico que presentan algunos episodios de isquemia e ictos cerebrales, cada vez más frecuentes en la población humana. En relación con los datos aportados en esta tesis, resulta especialmente interesante el hecho de que en las células BV-2 (microglía de ratón), el tratamiento previo con GLP-2 inhibió la fosforilación de la ERK1/2 y la señalización de las rutas inflamatorias inducidas por LPS²²⁴, lo que puede abrir nuevos caminos en la utilización terapéutica del GLP-2. En este sentido, pueden resultar de interés nuestros resultados (**ver**

figura del anexo) indicando que los astrocitos incubados en presencia de LPS, redujeron la densidad celular, que fue dosis-dependientemente revertida por la adición de GLP-2.

No obstante, el efecto directo de la glucosa sobre las diferentes vías de señalización que inducen proliferación en los astrocitos en cultivo no ha sido suficientemente abordado. Además, teniendo en cuenta que la insulina y el GLP-2 produjeron respuestas biológicas diferentes (a veces opuestas) en nuestras células, dependiendo del contenido en glucosa del medio de estimulación, nos propusimos estudiar el efecto de la glucosa (en ausencia y presencia de insulina o GLP-2) sobre la expresión de determinados mediadores de la señalización celular de la insulina y el IGF-1, algunos de los cuales pertenecen a vías de señalización comunes, siendo también activados por otros muchos ligandos y, por tanto, dando lugar a respuestas biológicas similares^{128,192,198}.

9.1. Efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de IR, IGF-1R e IRS-1.

Se ha descrito con anterioridad que la proliferación de los astrocitos inducida por GLP-2 podía ser mediada por AMPc¹⁷³ y por las MAP quinasas¹⁷⁴. También se había demostrado que el GLP-2 aumentaba la expresión del ARNm del IGF-1R¹⁷⁴. Puesto que no era conocido el efecto de la concentración de glucosa sobre la expresión de los receptores de insulina e IGF-1, ni sobre la expresión del IRS-1, en primer lugar, abordamos este estudio. Nuestros resultados muestran, por primera vez, que las expresiones de IR (**figuras 40A y C**) e IGF-1R (**figuras 41A y C**) en los astrocitos de rata en cultivo fueron muy sensibles a la concentración de glucosa en el medio, ya que presentaron diferencias incluso a los 5 minutos de incubación. En este corto plazo de tiempo, los incrementos de expresión de las proteínas probablemente fueran debidos a la estimulación de la traducción a partir de los ARNm previamente formados, mientras que a las 24 horas posiblemente también se indujera la

expresión génica. Además, los efectos del GLP-2 sobre el IR parecen seguir un patrón de comportamiento similar al obtenido con la insulina independientemente del tiempo de incubación y de la concentración de glucosa (**figuras 40B y D**), mientras que este comportamiento fue bastante diferente en relación a la expresión del IGF-1R (**figuras 41B y D**). A diferencia de lo descrito en ciertas células intestinales, en donde el GLP-2 induce la expresión del IGF²²⁵, resulta especialmente interesante confirmar que, en los astrocitos, el GLP-2 induce la expresión del IGF-1R, aunque solo en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (**figuras 41B y D**).

Teniendo en cuenta los resultados precedentes, la proliferación celular (**figura 1**) y la expresión de los receptores de GLP-2 (**figura 18**), insulina (**figura 40**) e IGF-1 (**figura 41**) en los astrocitos parece ser dependiente de la concentración de glucosa y, en determinadas circunstancias, también de la presencia de GLP-2 o de insulina. Es conocido que la unión de la insulina a su receptor inicia una cascada de señales que pasa por la fosforilación en tirosina de ciertos sustratos, incluyendo el IRS-1¹²⁸. Este sustrato también se inactiva por fosforilación, principalmente en residuos de serina/treonina²²⁶; por ello, se abordó la siguiente cuestión: ¿cuál es el efecto de los tratamientos descritos sobre la expresión de las formas activas e inactivas de IRS-1?

La glucosa modificó la expresión de la proteína total solo a elevadas concentraciones. Como sucediera con IR, a los 5 minutos de incubación, la expresión de IRS-1 disminuyó en las células incubadas con 15 y 25 mM de glucosa (**figura 42A**). Sin embargo, a diferencia de lo observado con IR, a tiempos más largos (**figuras 43A y 44A**), la expresión no disminuyó respecto a las células incubadas con las menores concentraciones de glucosa. Estos resultados parecían indicar que la proteína IRS-1 era bastante estable. Para hacernos una idea de su tiempo de recambio, la expresión de la proteína también se cuantificó en las células incubadas con cicloheximida. Sorprendentemente, la expresión se mantuvo constante,

independientemente de la concentración de glucosa (**figura 45A**), lo que sugería una baja tasa de degradación de IRS-1, probablemente debido a que esta proteína adaptadora cambia de localización celular dependiendo de su estado de fosforilación²²⁷. En general, las células tratadas con insulina presentaron mayores niveles de IRS-1 que los controles (**figuras 42B, 43B y 44B**), lo que sugería la “síntesis de novo” de la proteína. Situación que fue confirmada por la casi desaparición de la misma en las células incubadas con cicloheximida (**figura 45B**).

Por su parte, nuestros resultados parecen indicar que el GLP-2 tiene a largo plazo dos funciones bien diferenciadas sobre la expresión de IRS-1: primero, un ligero papel estimulador (**figura 44B**) y, segundo, un claro papel inhibidor de su degradación, puesto que en presencia de cicloheximida, el contenido celular de IRS-1 fue similar al de las células control (**figura 45B**).

La expresión basal de la forma activa de IRS-1 (fosforilación en Tyr-612) a los 5 minutos de incubación fue muy baja. En general, la expresión inducida por glucosa siguió la tendencia marcada por la expresión de IR e IGF-1R. Como cabría esperar, la expresión relativa de p-IRS-1^{Tyr-612} fue significativamente estimulada por insulina. Por el contrario, la expresión de esta forma activa fue inhibida por GLP-2 (**figura 42D**), lo que parecía indicar que el GLP-2 podría inducir la activación de alguna de las proteína tirosina fosfatasas que catalizan la desfosforilación del IRS-1^{228,229,230}. No obstante, nuestros resultados demuestran claramente que pIRS-1^{Tyr-612} no media los efectos biológicos de este péptido en los astrocitos de rata en cultivo.

También estudiamos la expresión en las Ser-636/639 de IRS-1, que da lugar a la inactivación de esta proteína adaptadora. Se ha descrito que mTOR y P70S6K fosforilan estos residuos de IRS-1²³¹. A los 5 minutos, su expresión disminuyó de manera dosis-dependiente con el aumento de la concentración de glucosa (**figura 42E**) lo que sugiere la inmediata activación de alguna proteína serina/treonina fosfatasa²³². Como cabría esperar, a tan corto

periodo de tiempo, la insulina no tuvo efecto (**figura 42F**). Tampoco se observó efecto por parte del GLP-2 (**figura 42F**), a pesar de que a través del receptor de este péptido se induce la activación de la PKA, que a su vez fosforila y activa la PP1²³³. A partir de los 10 minutos, se comenzó a observar la fosforilación en serina inducida por insulina y GLP-2, dependiente de la concentración de glucosa (**figuras 43C y 44C**).

Nuestros resultados demuestran claramente que, a diferencia de la insulina, los efectos biológicos del GLP-2 no están mediados por la activación de IRS-1.

9.2. Efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de proteínas implicadas en la señalización PI3K/Akt

Además de por la mediación de IR/IRS-1, el sistema de transducción de señales que induce la activación PI3K/Akt/mTOR/p70S6K también forma parte de la señalización de otros receptores, incluyendo el GLP-2R. Por ejemplo, en las líneas celulares intestinales IPEC-J2, para la formación y mantenimiento de las uniones estrechas²³⁴; en las células embrionarias de riñón humano HEK293, para aumentar la síntesis de proteínas⁶⁷ o en el intestino de ratón, para incrementar el transporte de aminoácidos³⁶. No obstante, se han descrito acciones del GLP-2 tan importantes como el incremento de la supervivencia de las células BHK transfectadas con el GLP-2R que son independientes de la señal mediada por PI3K/Akt⁸⁴. Por ello, hemos estudiado el efecto del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión relativa de las formas fosforiladas de los miembros más representativos de esta ruta de transducción de señales en los astrocitos, con el fin de encontrar nuevas situaciones que marquen diferencias entre ellas.

Puesto que la señalización de la insulina estaba plenamente activa a los 5 minutos de incubación y mostró ser independiente de la concentración de glucosa (**figura 42D**), la expresión de la p85-PI3K se estudió en presencia de la concentración de glucosa

más elevada (25 mM). Nuestros resultados indican que la expresión basal de la proteína total aumentó ligeramente con el tiempo de exposición (**figura 46A**) y en los primeros 5 minutos con el tratamiento de GLP-2 o insulina (**figura 46B**), lo que probablemente fuera debido a la traducción de los ARNm presentes en las células. Por otra parte, aunque la expresión de la proteína total y fosforilada inducida por ambos tratamientos tuvieron un comportamiento similar (**figuras 46B y C**), era evidente que la activación de la PI3K por GLP-2 no podía ser dependiente de IRS-1. Algunas cuestiones que no hemos tenido ocasión de responder por el momento son las siguientes: ¿la activación de PI3K inducida por GLP-2 en astrocitos depende solo de GLP-2R? ¿es mediada por la interacción entre la señalización de GLP-2/GLP-2R y la de algún otro receptor? ¿es dependiente de Ras? Se ha descrito que la activación de PI3K/Akt inducida por GLP-2 es mediada por la señalización de IGF-1/IGF-1R/IRS-2 o de ErbB en células gliales y neuronas entéricas⁸² y por EGFR, en ratones con alimentación parenteral total para mejorar la atrofia de la mucosa intestinal¹⁸¹.

Con el fin de encontrar nuevas diferencias entre los efectos de la insulina y el GLP-2, así como el papel de la glucosa, la expresión de Akt fue estudiada. Nuestros resultados muestran claramente que la glucosa incrementa la expresión de Akt a las 24 horas de incubación (**figura 47A**) y, además que, salvo a la más alta concentración de glucosa, tanto el GLP-2 como la insulina produjeron un incremento adicional de la expresión (**figura 47B**). En cuanto a la expresión de la forma fosforilada/activa, nuestros resultados muestran, una vez más, diferencias significativas entre los efectos de la insulina y el GLP-2. La insulina produjo un incremento significativo de la p-Akt^{Ser473}, independientemente de la concentración de glucosa (**figura 47C**). Estos resultados difieren de los obtenidos en astrocitos humanos tratados durante 4 días con 1 μ M de insulina en donde no se observaron cambios en los niveles de Akt fosforilada en Ser473²²⁷. Contrariamente a la insulina, el GLP-2 inhibió la expresión de la p-Akt^{Ser473}. Estos resultados difieren de los obtenidos in vivo de

aquellos obtenidos en la mucosa intestinal de ratones y cerdos con alimentación parenteral total, tratados con GLP-2^{85,181}.

La GSK3 es una proteína quinasa implicada en múltiples funciones celulares ya que tiene más de 100 proteínas diana²³⁵. Es sobradamente conocido que la activación por insulina de la vía PI3K/Akt estimula la fosforilación de GSK3 α/β en Ser-21/Ser-9, produciendo su inactivación. Nuestros resultados indican que la glucosa produjo efectos opuestos sobre la expresión de las isoformas α y β de la GSK3 (**figura 49A y C**). No hay resultados con los que poder comparar, salvo indirectamente con los que describen que la desnutrición no modificó la cantidad de ambas isoformas en la corteza cerebral de ratas lactantes²²⁰.

El valor conjunto de la expresión de la GSK3 fue usado como referencia para determinar la expresión de la de p-GSK3 α/β (Ser21/Ser9), cuyos valores no pudieron calcularse por separado. En general, se podría considerar que la fosforilación inmediata y tardía disminuye con el incremento de la concentración de glucosa (**figuras 50A y C**). Estos resultados podrían ser comparables con los que muestran que la desnutrición incrementaba la fosforilación de GSK3 en la corteza cerebral de ratas lactantes²²⁰.

A las 24 horas, los efectos de la insulina y el GLP-2 sobre la fosforilación de la GSK3, fueron prácticamente superponibles y más elevados en presencia de altas concentraciones de glucosa (**figura 50D**). Sin embargo, a los 5 minutos, la insulina estimuló y el GLP-2 inhibió la fosforilación de la GSK3 de manera dependiente de la concentración de glucosa (**figura 50B**). Este efecto regulador del GLP-2 sobre la fosforilación de la GSK3 en astrocitos está de acuerdo con lo descrito en diversos modelos animales^{22,85,181}. Por otra parte, también se ha descrito que el GLP-2 puede inducir la fosforilación de GSK3 de manera independiente de PI3K, pero dependiente de PKA⁸⁴.

La mTOR (diana de rapamicina en mamífero) es una serina/treonina proteína quinasa implicada en múltiples procesos celulares, incluyendo proliferación y supervivencia,

pero también en la patogénesis de la neuroinflamación²³⁶ y en los efectos beneficiosos del ejercicio sobre la función cognitiva y la salud mental²³⁷. Comprende dos complejos: mTORC1 y mTORC2. mTOR es la subunidad catalítica de mTORC1²³⁸. Ambos complejos responden a señales hormonales y factores de crecimiento, pero solo mTORC1 incrementa su actividad en respuesta a la abundancia de nutrientes²³⁹, tales como glucosa y aminoácidos²³⁸. Varias proteínas quinasas actúan sobre mTOR, fosforilando diversos residuos y regulando su actividad. Akt y p70S6K fosforilan la Ser-2448 de mTOR incrementando su actividad quinasa²⁴⁰. La mTOR fosforila la Thr-389 de la p70S6K^{237,241} y esta, a su vez, fosforila la proteína ribosomal S6.

Nuestros resultados muestran que la expresión de mTOR se incrementó de manera inmediata y dosis-dependiente de glucosa (**figura 51A**) y, además, en presencia de la mayor concentración de glucosa ensayada, que el efecto estimulador aumentó con el tiempo de incubación (**figura 52A**). Por el contrario, a tiempos largos, la glucosa produjo el efecto contrario (**figura 53A**). La insulina y algo menos el GLP-2 también modificaron la expresión de mTOR total a tiempos cortos (**figura 51B**), pero no a tiempos largos (**figura 53B**). La fosforilación en la Ser-2448 a todos los tiempos fue regulada tanto por insulina como por GLP-2 de forma dependiente de la concentración de glucosa (**figuras 51C, 52C y 53C**). No tenemos una explicación para ello, salvo que en los astrocitos el papel estimulador/inhibidor de las demás fosforilaciones de mTOR sea fundamental²⁴⁰.

Por otra parte, a diferencia de lo mostrado para mTOR, a las 24 horas, tanto la insulina como el GLP-2 inhibieron la expresión de la P70S6K (**figura 54B**) y ambos ligandos esimularon de forma significativa la fosforilación y por tanto la activación de esta quinasa (**figura 54C**). Este resultado nos sugiere que, a las 24 horas, al menos una forma activa de mTOR debe estar presente en todas las condiciones experimentales estudiadas, lo que indica una diferente vía de activación del complejo mTORC2²⁴¹ y que no sea esta quinasa, sino

p70S6K, la principal responsable de la inactivación del IRS-1 en los astrocitos en las condiciones experimentales estudiadas (**figura 44**).

A las 24 horas, el contenido total de S6 disminuyó de forma significativa con el aumento de la glucosa (**figura 55A**) y fue regulada por insulina y por GLP-2 de forma dependiente de la concentración de glucosa (**figura 55B**). No obstante, a pesar de que la insulina y el GLP-2 mantuvieron activa la P70S6K, solo el GLP-2 modificó la forma fosforilada de la S6 (**figura 55C**).

No hemos encontrado en la literatura científica datos con los que podamos comparar nuestros resultados.

9.3. Efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la expresión de proteínas situadas corriente debajo de la activación de PI3K/Ras.

Las ERK1/2 (quinasas reguladoras de señales extracelulares) son componentes de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK de transducción de señales implicados en diversos procesos celulares, incluyendo la regulación de la proliferación y la diferenciación de los astrocitos²⁴². Por ello, hemos estudiado el efecto de la glucosa, la insulina y el GLP-2 sobre la activación de la ERK en los astrocitos de rata en cultivo. Nuestros resultados indican que el contenido total de ERK1/2 disminuyó a las dosis más altas de glucosa (**figura 56A**) y fue regulado por insulina y GLP-2 de manera dependiente de la concentración de glucosa (**figura 56B**). Tanto la insulina como el GLP-2 estimularon significativamente la expresión de la forma fosforilada, independientemente de concentraciones de glucosa (**figura 56C**). Estos resultados están de acuerdo con los previamente descritos por nuestro grupo mostrando que la insulina y el GLP-2 inducían la rápida fosforilación de la ERK en los astrocitos en presencia de suero desnaturalizado y presentando, además, un efecto sinérgico¹⁷⁴ y podrían

diferir de otros que indican que la desnutrición reduce la fosforilación de la ERK en corteza de ratas lactantes²²⁰.

En resumen, dado que la insulina estimuló la inmediata (5 min) fosforilación en tirosina (no en serina) de IRS-1 (**figura 42**), mientras que el GLP-2 la disminuyó, parecía evidente que el efecto del GLP-2 sobre la activación de la ERK no estaba mediado por el IRS-1. Estos resultados sugieren que el GLP-2/GLP-2R activa una vía de señalización alternativa a la de la insulina que también induce la estimulación de la fosforilación de ERK y así explicaría los efectos sinérgicos de ambos péptidos descritos con anterioridad.

Efectivamente, el GLP-2R es capaz de acoplarse a diferentes heterotrómeros de proteínas G, activar diversas vías de señalización y dar lugar a acciones biológicas muy diferentes dependiendo del tipo celular. Por el contrario, el GLP-2 también puede inducir un mismo efecto biológico, por ejemplo, la proliferación celular y la activación de ERK, mediante rutas de transducción de señales diferentes, dependiendo del tipo celular. Así, en las células Caco2 hipóxicas, transfectadas con el GLP-2R, el GLP-2 produjo estos efectos mediante la activación de la vía de la PI3K²⁴³. Por el contrario, en las células HeLa, el GLP-2R está acoplado a las proteínas Gi/Go, dependiente de las subunidades $\beta\gamma$, y la activación de ERK1/2 se produce a través de la señalización mediada por Ras²⁴⁴. Asimismo, se ha descrito que el GLP-2 puede inducir la activación de las ERKs por mecanismos tanto dependientes como independientes de PKA²². Por ejemplo, en las células epiteliales del intestino de cerdos recién nacidos, el GLP-2 indujo la fosforilación de ERK1/2 a través de vías que incluyen la activación de PKA y Akt⁸⁵, mientras que en cultivos primarios derivados del plexo submucoso del colon de rata y de ratón, el GLP-2 estimuló la expresión de las formas activas de ERK1/2 sin afectar a la producción intracelular de AMPc⁸².

10. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES α_1 , β_1 Y α_2 DE LA GUANILATO CICLASA SOLUBLE

El efecto de diversos estímulos, y en consecuencia de diferentes vías de transducción de señales, sobre la regulación de la expresión génica de las tres subunidades que componen el heterodímero activo ($\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$) de la guanilato ciclasa soluble, el receptor celular de NO, ha sido estudiado in vivo y también en cultivos celulares procedentes de diferentes tejidos.

En general, la mayoría de los estímulos estudiados disminuyen la expresión de, al menos, una de las subunidades, lo que puede ser origen de diversas enfermedades, incluyendo hipertensión, inflamación, aterosclerosis y trastornos neurodegenerativos²⁴⁵. Los efectos pueden ocurrir de manera muy rápida (1-3 horas), como la disminución de los ARNm de las subunidades α_1 y β_1 en el útero de ratas tratadas con estradiol²⁴⁶ o tener lugar tras periodos largos (48 horas) de incubación, como la disminución de la expresión del ARNm de la subunidad α_2 en células β -pancreáticas, tratadas con melatonina²⁴⁷.

Está suficientemente establecido que la vía de señalización NO-GMPc-PKG está implicada en la regulación de la plasticidad y la transmisión sináptica y en el desarrollo del cerebro²⁴⁸. No obstante, el estudio de los mecanismos implicados en la regulación de esta vía de señalización en el cerebro presenta cierta dificultad, pues mientras unos autores¹¹⁶ consideran que el cerebro es el único órgano en donde los heterodímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ se expresan en la misma proporción, otros²⁴⁹ consideran que existen importantes diferencias en la expresión y distribución de las subunidades de la GCs en este órgano y también notables diferencias regionales en la composición de la forma activa de la GCs. Además, en cultivos primarios procedentes de células granulares de cerebelo de rata, se ha mostrado que el nivel

de expresión de una subunidad en particular varía dependiendo del estado de desarrollo celular, determinado por el tiempo del cultivo. Asimismo, mientras que el ARNm de la subunidad β_1 aumentó con el grado de diferenciación celular inducido por el tratamiento con N-metil-D-aspartato (NMDA), el contenido del ARNm de la subunidad α_2 desplazó al de la α_1 en las células maduras. Es decir, se produjo la transición de $\alpha_1\beta_1$ a $\alpha_2\beta_1$ ²⁵⁰.

La señalización mediada por el GMPc parece tener gran importancia en la función de la glía en el cerebro sano y enfermo²⁴⁸. Sin embargo, esta vía de señalización ha sido relativamente poco estudiada en los astrocitos de corteza en cultivo. Asimismo, ha sido ampliamente documentado que las vías de señalización mediados por el AMP cíclico y el GMP cíclico producen, en general, efectos biológicos contrapuestos, incluyendo la proliferación celular. Por ello, se ha estudiado el efecto de diversos agentes, que pueden afectar la proliferación de los astrocitos a través de diversas vías de transducción de señales, sobre la expresión génica de las subunidades que conforman el heterodímero activo de la GCs.

10.1. La glucosa, el GLP-2 y la insulina (en ausencia y presencia de GLP-2) modifican la expresión de las subunidades α_1 , β_1 y α_2 de la guanilato ciclasa soluble en los astrocitos de rata en cultivo

Como hemos señalado en este trabajo, la glucosa parece tener influencia sobre los mecanismos de señalización que median los efectos biológicos del GLP-2 y de la insulina. Dado que no existe información acerca de la relación entre la glucosa y la señalización de NO/GCs/GMPc, nos pareció de gran interés estudiar la influencia de la glucosa sobre la expresión de las subunidades α_1 , β_1 y α_2 de la GCs.

Nuestros resultados muestran por primera vez que, a las 24 horas de incubación, el contenido total a nivel de proteína de las tres subunidades fue incrementado por la glucosa

de manera dosis-dependiente (**figuras 57A, C y E**). Un aspecto importante que cabe destacar de este resultado es el siguiente: comparados los valores obtenidos en presencia de la mayor y menor concentración de glucosa ensayadas, las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ incrementaron su contenido en igual proporción (6,65 veces, aproximadamente), más del doble de lo que lo hiciera la subunidad $\beta 1$.

En estas condiciones, también se estudiaron los efectos del GLP-2, de la insulina y del GLP-2+insulina (**figuras 57B, D y F**). En general, el efecto relativo del GLP-2, comparado con el de los controles, sobre cada una de las subunidades de la GCs fue decreciendo con el aumento de la concentración de glucosa. No existen resultados con los que podamos comparar. No obstante, resultados previos de nuestro grupo¹⁷⁶, realizados en presencia de 17,5 mM de glucosa, mostraron que, en la fracción celular total, a las 24 horas de incubación, el tratamiento de los astrocitos con GLP-2 produjo una disminución de las expresiones de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$, que fue concordante con la disminución de la producción de GMPC.

En las células tratadas con insulina, la expresión de la $\alpha 1$ fue siempre superior a la de los controles. Salvo en presencia de la concentración de glucosa más elevada, a la que la insulina disminuyó los contenidos de $\beta 1$ y $\alpha 2$, a las demás concentraciones de glucosa, la cantidad de $\beta 1$ aumento y la de $\alpha 2$ no varió respecto a sus controles (**figuras 57B, D y F**). Aun teniendo en cuenta las diferentes condiciones experimentales, estos resultados podrían ser comparables con aquellos previos¹⁷⁶, como también podrían serlo aquellos en los que se añadió conjuntamente GLP-2+insulina, cuyo efecto fue inferior al obtenido con la insulina sola.

De nuevo resulta importante destacar que en los astrocitos de corteza de rata en cultivo, bajo ninguna de las condiciones estudiadas, el contenido total de las diferentes subunidades no se corresponde con la relación equimolecular de los dos heterodímeros

activos de la GCs, lo que estaría de acuerdo con los resultados que sugieren que, además de ser componentes del receptor sensible a NO, que produce GMPc, las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ también pueden desempeñar otras importantes funciones celulares^{117,118,119,120,121,122,123,124,152}.

10.2. El GLP-2 y la insulina (en ausencia y presencia de GLP-2) modifican la expresión génica de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclasa soluble en los astrocitos de rata en cultivo

Para estudiar con mayor profundidad la influencia del GLP-2 y de la insulina sobre la expresión y la localización de las subunidades de la GCs, los siguientes experimentos se realizaron en presencia de 5,5 mM de glucosa, concentración preferentemente utilizada en los escasos estudios in vitro relacionados con este tema.

Como se observa en la **figura 58**, la expresión del ARNm- $\alpha 1$ en las células incubadas con GLP-2 solo fue superior a la de los controles a las 16 horas de incubación. Este nuevo ARNm puede ser responsable del gran aumento de proteína $\alpha 1$ que se observa a las 24h en la fracción total (**figura 59A**). Sin embargo, a diferencia de lo que sucedió tras 1 hora de incubación, a las 24 horas, la mayor parte de esta subunidad no se encontró en la fracción citosólica (**figura 59B**). El GLP-2 inhibió la expresión del ARNm- $\beta 1$ casi durante todo el periodo (**figura 60**). Sin embargo, la cantidad de proteína determinada en la fracción total solo aumentó en los primeros tiempos de incubación (**figura 61A**), aunque a los dos tiempos estudiados se encontró mayoritariamente en el citosol y muy especialmente a las 24 horas (**figura 61B**). No tenemos una explicación para el incremento de la cantidad de proteína que encontramos en las células incubadas con GLP-2 a los tiempos más cortos cuando la transcripción está disminuida, salvo que el péptido tuviera algún efecto sobre la regulación de la estabilidad del ARNm- $\beta 1$ y por tanto sobre su tasa de traducción^{251,252,253}.

Estos resultados sugieren que el GLP-2 solo podría estimular la formación del herodímero activo $\alpha 1\beta 1$ en la fracción citosólica a los 60 minutos de incubación. El exceso de $\beta 1$ con respecto a la $\alpha 1$ en el citosol a las 24 h, podría estar relacionada con otras funciones de esta subunidad y que requieren su interacción con otras proteínas¹²⁵. El GLP-2 también demostró tener un efecto regulador sobre la expresión del ARNm/ $\alpha 2$ (**figura 62**). Puesto que no tenemos resultados de la expresión de $\alpha 2$ a nivel de proteína, desconocemos si en algún momento habría niveles elevados del herodímero $\alpha 2\beta 1$.

Como se observa en la **figura 58**, la insulina produjo un marcado incremento de la expresión del ARNm/ $\alpha 1$, suficiente como mantener elevados el contenido total de proteína durante todo el periodo experimental (**figura 59C**), aunque solo a las 24 horas esta subunidad fue mayoritariamente localizada en el citosol (**figura 59D**). La insulina también incrementó durante todo el tiempo la expresión del ARNm/ $\beta 1$ (**figura 60**) y, salvo a las 16 horas, el contenido total de proteína (**figura 61C**). Puesto que la cantidad de proteína no aumentó en la fracción citosólica (**figura 61D**), podría indicar que, en estas condiciones, la insulina no promueve la formación del herodímero activo $\alpha 1\beta 1$. Curiosamente, el patrón de expresión ARNm/ $\alpha 2$ (**figura 62**) fue muy similar al descrito para el ARNm/ $\alpha 1$, pero desconocemos si se forma el heterodímero $\alpha 2\beta 1$.

Por el momento, el efecto directo de la insulina sobre la producción de GMPc o la regulación de las subunidades de la GCs ha sido escasamente estudiado, por lo que no hay datos en astrocitos, ni tampoco en cerebro, con los que poder comparar nuestros resultados. En general, los estudios del efecto de la insulina sobre la señalización del GMPc solo han fijado su atención en la regulación de la expresión de las diferentes óxido nítrico sintasas (NOS). En relación a la regulación de las NOS, el efecto del GLP-2 ha sido recientemente estudiado. Así, el GLP-2 redujo la actividad iNOS en el duodeno y en el íleon de cerdos

hembras de 21 días¹⁸⁸, e incrementó la expresión de nNOS en el fondo de las criptas del intestino de ratón²⁵⁴.

Un aspecto importante que merece ser destacado de nuestros resultados es que el GLP-2 revirtió los efectos de la insulina sobre la expresión de los ARNm de las tres subunidades de la GCs, siendo especialmente significativo a los tiempos más largos (**figura 58, 60 y 62**). Este efecto podría estar parcialmente relacionado con la expresión de proteínas implicadas en la regulación la estabilidad de los mensajeros^{251,252,253}.

Asimismo, en general el GLP-2 también revirtió el efecto de la insulina sobre la cantidad de proteína en las fracciones total y citosólica, salvo para la subunidad $\alpha 1$ a 1 hora de incubación (**figuras 59 y 61**).

A la vista de estos resultados, sería de sumo interés conocer el mecanismo molecular inducido por GLP-2 capaz de revertir los efectos estimuladores de la insulina sobre la señalización de NO/GCs/GMPc

Otro objetivo importante para el futuro será estudiar si existe correlación entre los resultados aquí expuestos y la producción intracelular de GMPc o, incluso, de nucleótidos cíclicos de pirimidina, pues recientemente se ha descrito que el NO también induce la producción de CMPc y UMPc tanto por la $\alpha 1\beta 1$ purificada, como en las células HEK293 y RFL-6²²⁴.

10.3. El EGF (en ausencia y presencia de GLP-2) modifica la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclase soluble en los astrocitos de rata en cultivo

Salvo los resultados previos de nuestro grupo¹⁷⁶, mostrando que el tratamiento con EGF de los astrocitos (con alta concentración de glucosa), produjo la disminución de los niveles intracelulares de GMPc y de la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la GCS en la fracción

citoplasmática, no existen estudios que relacionen directamente el tratamiento con EGF y la regulación de la expresión de las subunidades de la GCs. Al igual que comentamos para la insulina, los estudios con EGF están más orientados a la regulación de la expresión de las NOS. No obstante, en este trabajo nos propusimos estudiar el efecto del EGF sobre la expresión los ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ y de las proteínas $\alpha 1$, $\beta 1$ en la fracción citoplasmática de los astrocitos mantenidos en un medio conteniendo 5,5 mM de glucosa (**figura 63**).

Nuestros resultados indican que el EGF regula la expresión de los ARNm de las tres subunidades de GCs y de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ en la fracción citoplasmática, de manera dependiente del tiempo. En general, los efectos del EGF fueron modificados por el GLP-2

muestran una estrecha relación entre la expresión temporal del ARNm y la proteína de la subunidad $\alpha 1$ inducida por EGF y por EGF+GLP-2. Después de 1 y 4 horas de incubación, el EGF disminuyó el contenido de los dos parámetros valorados, mientras que a las 16 y 24 horas, ambos fueron aumentados y en todos los casos, la incubación con EGF+GLP-2 redujo los efectos del EGF. Tampoco tenemos una explicación consistente para estos cambios, aunque quizás estén relacionados con las funciones independientes de la producción de GMPc descritas para las subunidades de la GCs^{117,118,119,120,121,122,123,124,125}.

10.4. La forskolina (en ausencia y presencia de GLP-2) modifica la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\alpha 2$ de la guanilato ciclase soluble en los astrocitos de rata en cultivo

Nuestro grupo¹⁷³ había descrito que, en los astrocitos en cultivo, el GLP-2 incrementaba la producción de AMPc. Por ello, nos interesó determinar si la forskolina, un potente inductor de la liberación de AMPc, tenía efecto sobre la expresión de los ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ de la GCs en estas células.

Nuestros resultados indican que la forskolina regula la expresión de los ARNm de las tres subunidades. En general, produce una estimulación a los tiempos más cortos, mientras que a tiempos largos produce una casi completa inhibición (**figuras 64A, B y C**). En presencia de GLP-2, el patrón de expresión fue casi superponible al observado con la forskolina (excepto sobre la $\beta 1$ a las 4 horas).

Estos resultados concuerdan otros que indican que el tratamiento con forskolina durante 24 horas produjo una disminución de la expresión del ARNm/ $\beta 1$ en las células RFL-6²²⁵, de la expresión de los ARNm de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ en las células musculares lisas de aorta de rata^{245,251,257} y la expresión del ARNm/ $\alpha 1$ en las células PC-12²⁵⁵.

En conclusión, los resultados expuestos parecen sugerir que el GLP-2 afecta a la expresión génica de las subunidades de la GCs mediante diversos mecanismos, a su vez dependientes de la concentración de glucosa, del tiempo de estimulación y de la presencia o no de otros ligandos en el medio de estimulación.

CONCLUSIONES

- El efecto mitogénico realizado por GLP-2 sobre los astrocitos tiene lugar a través de su propio receptor y es dependiente de la concentración de glucosa.
- La glucosa promueve la proliferación de los astrocitos y regula la expresión del GLP-2R.
- La glucosa regula la expresión de sensores metabólicos (AMPK), de factores (SREBP-1c) y coactivadores (PCG1 α) de la transcripción.
- Los astrocitos de la corteza cerebral de rata expresan el sistema sensor de glucosa GLUT-2/GK y en su regulación intervienen la glucosa, el GLP-2 y la insulina.
- La glucosa regula la expresión/actividad de varias proteínas implicadas en la transducción de señales generadas por insulina y otros ligandos (IRS-1, PI3K, Akt, GSK3, mTOR, p70S6K, ERK1/2), así como la expresión de las proteínas que conforman la GCs.
- En términos generales, la expresión/activación de las proteínas que intervienen en las señales generadas por el GLP-2 y por la insulina en los astrocitos son dependientes de la concentración de glucosa.
- Los efectos biológicos del GLP-2 no están mediados por la activación del IRS-1, aunque comparten algunos componentes de la señal de la insulina.
- La insulina y el GLP-2 regulan la expresión de las subunidades componentes de la GCs siendo más marcado el efecto producido por la insulina. Ambos péptidos regulan además su localización celular. La presencia del GLP-2 bloqueó el potente efecto producido por la insulina sobre los componentes de la GCs.

Dado que la glucosa ha mostrado tener un efecto tan significativo sobre la expresión/actividad de mediadores envueltos en procesos tan importantes como la proliferación o el metabolismo celular de los astrocitos, un estudio más profundo de los

mecanismos moleculares subyacentes podría aportar nuevas luces sobre el conocimiento de los factores implicados en enfermedades tan extendidas como la diabetes, la neurodegeneración o, incluso, el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Marathe SC, Rayner KC, Jones LK, Horowitz M.** Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: A review. *Peptides*. 2013;44:75-86.
2. **Pujadas G, Drucker DJ.** Vascular Biology of Glucagon Receptor Superfamily Peptides: Mechanistic and Clinical Relevance. *Endocr Rev*. 2016;37:554–583.
3. **Drucker DJ, Habener JF, Holst JJ.** Discovery, characterization, and clinical development of the glucagon-like peptides. *J Clin Invest*. 2017;127(12):4217-4227.
4. **Blázquez E, Muñoz-Barragan L, Patton GS, Orci L, Dobbs RE , Unger RH.** Gastric A-cell Functions in insulin-Deprives Depancreatized Dogs. *Endocrinology*. 1976;99(5):1182-1188
5. **Perez-Castillo A, Blázquez E.** Tissue distribution of glucaon, glucagonlike immunoreactivity, and insulin in the rat. *Am J Physiol*. 1980;238(1):E258-E266.
6. **Sandoval DA, D'Alessio DA.** Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev*. 2015;95:513–548.
7. **Drucker DJ, Yusta B.** Physiology and Pharmacology of the Enteroendocrine Hormone Glucagon-Like Peptide 2. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:561-583.
8. **Jin T.** Mechanisms underlying proglucagon gene expression. *J Endocrinol*. 2008;198(1):17–28.
9. **Baldassano S, Amato A, Mulè F.** Influence of glucagon-like peptide 2 on energy homeostasis. *Peptides*. 2016;86:1-5.
10. **Elsabagh M, Inabu Y, Obitsu T, Sugino T.** Response of plasma glucagon-like peptide-2 to feeding pattern and intraruminal administration of volatile fatty acids in sheep. *Domest Anim Endocrinol*. 2017;60:31–41.
11. **Brubaker PL, Crivici A, Izzo A, Ehrlich P, Tsai CH, Drucker DJ.** Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology*. 1997;138:4837–4843.
12. **Westberg-Rasmussen S, Starup-Linde J, Hermansen K, Holst JJ, Hartmann B, Vestergaard P, et al.** Differential impact of glucose administered intravenously or orally on bone turnover markers in healthy male subjects. *Bone*. 2017;97:261–266.
13. **Said H, Kaunitz JD.** Gastrointestinal Defense Mechanisms. *Curr Opin Gastroenterol*. 2016;32(6):461-466.
14. **Morrison SY, Pastor JJ, Quintela JC, Holst JJ, Hartmann B, J. K. Drackley JK, et al.** Short communication: Promotion of glucagon-like peptide-2 secretion in dairy calves with a bioactive extract from *Olea europea*. *J. Dairy Sci*. 2016;100:1940–1945.
15. **Iacobellis G, Camarena V, Sant DW, Wang G.** Human Epicardial Fat Expresses Glucagon-Like Peptide 1 and 2 Receptors Genes. *Horm Metab Res*. 2017;49(8):625-630.

16. **Cazzo E, Pareja JC, Geloneze B, Chaim ES, Lazzarini Barreto MR, Oliveira Magro D.** Postprandial GLP-2 Levels Are Increased After Biliopancreatic Diversion in Diabetic Individuals with Class I Obesity: a Prospective Study. *Obes Surg.* 2017;27:1809–1814.
17. **Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Sioka E, Chatedaki C, Zacharoulis D.** Impact of Bariatric Surgery on Metabolic and Gut Microbiota Profile: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg.* 2017;27:1345–1357.
18. **Oliveira Magro D, Cazzo E, Kotze PG, Junqueira Vasques AC, Real Martinez CA, Chaim EA, et al.** Situations: a Controlled Comparison Among Individuals with Crohn's Disease and Individuals with Obesity Before and After Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2018;28(2):378-388.
19. **Cazzo E, Pareja JC, Chaim EA, Coy CSR, Oliveira Magro D.** Comparison of the levels of C-reactive protein, GLP-1 and GLP-2 among individuals with diabetes, morbid obesity and healthy controls: an exploratory study. *Arq Gastroenterol.* 2018;55(1):72-77.
20. **De Laat MA, Fitzgerald DM, Sillence MN, Spence RJ.** Glucagon-like peptide-2: A potential role in equine insulin Dysregulation. *Equine Vet J.* 2018. doi: 10.1111/evj.12825. [En prensa]
21. **Janssen P, Rotondo A, Mule F, Tack J.** Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(1):18-36.
22. **Mayo BJ, Stringer AM, Bowen JM, Bateman EH, Keefe DM.** Irinotecan-induced mucositis: the interactions and potential role of GLP-2 analogues. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79:233–249.
23. **Drucker DJ, Shi Q, Crivici A, Sumner-Smith M, Tavares W, Hill M, et al.** Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Nat Biotechnol.* 1997;15:673–677.
24. **Thulesen J, Knudsen LB, Hartmann B, Hastrup S, Kissow H, Jeppesen PB, et al.** The truncated metabolite GLP-2 (3–33) interacts with the GLP-2 receptor as a potential agonist *Reg Peptides.* 2002;103:9–15.
25. **Jeppesen PB.** Pharmacologic Options for Intestinal Rehabilitation in Patients With Short Bowel Syndrome. *J Parenter Enteral Nutr.* 2014;38:45S-52S.
26. **Salaga M, Mokrowiecka A, Zielinska M, Malecka-Panas E, Kordek R, Kamysz E, et al.** New Peptide Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV, EMD8-1 Extends the Half-Life of GLP-2 and Attenuates Colitis in Mice after Topical Administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;363(1):92-103.
27. **Sueyoshi R, Ignatoski KMW, Okawada M, Hartmann B, Holst J, Teitelbaum DH.** Stimulation of intestinal growth and function with DPP4 inhibition in a mouse short bowel syndrome model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(4):G410-9.

28. **Kim ES, Keam SJ.** Teduglutide: A Review in Short Bowel Syndrome. *Drugs*. 2017;77(3):345-352.
29. **Jeppesen PB, Gabe SM, Seidner DL, Lee H-M, Olivier C,** Factors Associated with Response to Teduglutide in Patients With Short-bowel. *Gastroenterology*. 154(4):874-885.
30. **Iturrino J, Camilleri M, Acosta A, O'Neill J, Burton D, Varayil JE, et al.** Acute Effects of a Glucagon-Like Peptide 2 Analogue, Teduglutide, on Gastrointestinal Motor Function and Permeability in Adult Patients with Short Bowel Syndrome on Home Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2016;40(8):1089-1095.
31. **Billiauws L, Bataille J, Boehm V, Corcos O, Joly F.** Teduglutide for treatment of adult patients with short bowel syndrome. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(5):623-632.
32. **Klek S, Kunecki M, Sobocki J, Matysiak K, Karwowska K, Urbanowicz K.** The Polish Intestinal Failure Centres' consensus on the use of teduglutide for the treatment of short bowel syndrome. *Nutrition*. 2017;38:28-33.
33. **Gua J, Liua S, Mua N, Huang T, Zhanga W, Zhaob H, et al.** A DPP-IV-resistant glucagon-like peptide-2 dimer with enhanced activity against radiation-induced intestinal injury. *Journal of Controlled Release* 2017;260:32-45.
34. **Qi KK, Wu J, Wan J, Men XM, Xu ZW.** Purified PEGylated porcine glucagon-like peptide-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Peptides*. 2014;52:11-8.
35. **Qi KK, Lv JJ, Wu J, Xu ZW.** Therapeutic effects of different doses of polyethylene glycosylated porcine glucagon-like peptide-2 on ulcerative colitis in male rats. *BMC Gastroenterology*. 2017;17:34-42.
36. **Lee J, Koehler J, Yusta B, Bahrami J, Matthews D, Rafii M, et al.** Enteroendocrine-derived glucagon-like peptide-2 controls intestinal amino acid transport. *Mol Metab*. 2017;6(3):245-255.
37. **Tsimihodimos V, Elisaf MS.** Incretins And Lipid Metabolism. *Curr Med Chem*. 2018;25(18):2133-2139.
38. **Mulvihill EE.** Regulation of intestinal lipid and lipoprotein metabolism by the proglucagon-derived peptides glucagon like peptide 1 and glucagon like peptide 2. *Curr Opin Lipidol*. 2018, 29:95-103.
39. **Dash S, Xiao C, Morgantini C, Connelly PW, Bruce W. Patterson BW, Lewis GF.** Glucagon-Like Peptide-2 Regulates Release of Chylomicrons From the Intestine. *Gastroenterology*. 2014;147:1275-1284.
40. **Iakoubov R, Lauffer LM, Trivedi S, Kim YI, Brubaker PL.** Carcinogenic Effects of Exogenous and Endogenous Glucagon-Like Peptide-2 in Azoxymethane-Treated Mice. *Endocrinology*. 2009;150(9):4033-4043.

41. **Shawe-Taylor M, Kumar JD, Holden W, Dodd S, Varga A, Giger O, et al.** Glucagon-like peptide-2 acts on colon cancer myofibroblasts to stimulate proliferation, migration and invasion of both myofibroblasts and cancer cells via the IGF pathway. *Peptides*. 2017;91:49–57.
42. **Sigalet DL, Wallace L, De Heuvel E, Sharkey KA.** The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22(12):1318-1350.
43. **Kissow H, Viby NE, Hartmann B, Holst JJ, Timm M, Thim L, Poulsen SS.** Exogenous glucagon-like peptide-2 (GLP-2) prevents chemotherapy-induced mucositis in rat small intestine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70(1):39–48.
44. **Said H, Akiba Y, Narimatsu K, Maruta K, Kuri A, Iwamoto KI, et al.** FFA3 Activation Stimulates Duodenal Bicarbonate Secretion and Prevents NSAID-Induced Enteropathy via the GLP-2 Pathway in Rats. *Dig Dis Sci*. 2017;62:1944–1952.
45. **Saudi WS, Sjöblom M.** Short-chain fatty acids augment rat duodenal mucosal barrier function. *Exp Physiol*. 2017;102(7):791-803.3.
46. **Koopmann MC, Nelson DW, Murali SG, Liu X, Brownfield MS, Holst JJ, et al.** Exogenous glucagon-like peptide-2 (GLP-2) augments GLP-2 receptor RNA and maintains proglucagon RNA levels in resected rats. *J Parenter Enteral Nutr*. 2008;32(3):254-265.
47. **Lai SW, de Heuvel E, Wallace LE, Hartmann B, Holst JJ, Brindle ME, et al.** Effects of exogenous glucagon-like peptide-2 and distal bowel resection on intestinal and systemic adaptive responses in rats. *PLoS One*. 2017;24;12(7):e0181453.
48. **Jeppesen PB, Lund P, Gottschalck IB, Nielsen HB, Holst JJ, Mortensen J.** Short bowel patients treated for two years with glucagon-like Peptide 2: effects on intestinal morphology and absorption, renal function, bone and body composition, and muscle function. *Gastroenterol Res Pract*. 2009;2009:616054.
49. **Bremholm L, Hornum M, Henriksen BM, Larsen S, Holst JJ.** Glucagon-like peptide-2 increases mesenteric blood flow in humans. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(3):314-319.
50. **Dubé PE, Brubaker LP.** Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):460-465.
51. **Nerup N, Ambrus R, Lindhe J, Achiam M, Jeppesen PB, Svendsen LB.** The effect of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2 on microcirculation: a systematic review. *Microcirculation*.. 2017. doi: 10.1111/micc.12367. [En prensa]
52. **Guan X, Shi X, Li X, Chang B, Wang Y, Li D, et al.** GLP-2 receptor in POMC neurons suppresses feeding behavior and gastric motility. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303(7):853-864.

53. **Lei Q, Bi J, Chen H, Tian F, Gao X, Li N, et al.** Glucagon-like peptide-2 improves intestinal immune function and diminishes bacterial translocation in a mouse model of parenteral nutrition. *Nutrition Research*. 2018;49:56–66.
54. **Kvidera SK, Horst EA, Sanz Fernandez MV, Abuajamieh M, Ganesan S, Gorden PJ, et al.** Characterizing effects of feed restriction and glucagon-like peptide 2 administration on biomarkers of inflammation and intestinal morphology. *J. Dairy Sci.* 2017;100:9402–9417.
55. **Arana MR, Tocchetti GN, Zecchinati F, Londero AS, Dominguez C, Perdomo V, et al.** Glucagon-like peptide 2 prevents down-regulation of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein in endotoxemic rats. *Toxicology*. 2017;390:22-31.
56. **Benjamin MA, McKay DM, Yang PC, Cameron H, Perdue MH.** Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut*. 2000;47(1):112-119.
57. **Heer J1, Pedersen J, Orskov C, Holst JJ.** The alpha cell expresses glucagon-like peptide-2 receptors and glucagon-like peptide-2 stimulates glucagon secretion from the rat pancreas. *Diabetologia*. 2007;50(10):2135-2142.
58. **Muscogiuri G, Balercia G, Barrea L, Cignarelli A, Giorgino F, Holst JJ, et al.** Gut: A key player in the pathogenesis of type 2 diabetes? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;28:1-16.
59. **Ramsey W, Isaacs CM.** Intestinal Incretins and the Regulation of Bone Physiology. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1033:13-33.
60. **Henriksen DB, Alexandersen P, Bjarnason NH, Vilsbøll T, Hartmann B, Henriksen EE, et al.** Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2003;18(12):2180-2189.
61. **Khor CE, Wee NK, Baldock PA.** Influence of Hormonal Appetite and Energy Regulators on Bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(3):194-202.
62. **Askov-Hansen C, Jeppesen PB, Lund P, Hartmann B, Holst JJ, Henriksen DB.** Effect of glucagon-like peptide-2 exposure on bone resorption: effectiveness of high concentration versus prolonged exposure. *Regul Pept*. 2013;181:4–8.

63. **Yusta B, Matthews D, Flock GB, Ussher JR, Lavoie B, Mawe GM, et al.** Glucagon-like peptide-2 promotes gallbladder refilling via a TGR5-independent, GLP-2R-dependent pathway. *Mol Metab.* 2017;6(6):503–511.
64. **Lovshin JA, Huang Q, Seaberg R, Brubaker PL, Drucker DJ.** Extrahypothalamic expression of the glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to reduction of glutamate-induced cell death in cultured hippocampal cells. *Endocrinology.* 2004;145(7):3495-3506.
65. **Dalvi PS, Belsham DD.** Glucagon-Like Peptide-2 Directly Regulates Hypothalamic Neurons Expressing Neuropeptides Linked to Appetite Control in Vivo and in Vitro. *Endocrinology.* 2012;153:2385–2397.
66. **Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W.** Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1985;28:704–707.
67. **Shi X, Zhou F, Li X, Chang B, Li D, Wang Y, et al.** Central GLP-2 enhances hepatic insulin sensitivity via activating PI3 K signaling in POMC neurons. *Cell Metab.* 2013;2;18(1):86–98.
68. **Chi CL, Zhang S, Liu Z, Chang MX, Wang H, Huang Y.** Research on the role of GLP-2 in the central nervous system EPK signal transduction pathway of mice with vascular dementia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:131-137.
69. **Iwai T, Ohnuki T, Sasaki-Hamada S, Saitoh A, Sugiyama A, Oka J.** Glucagon-like peptide-2 but not imipramine exhibits antidepressant-like effects in ACTH-treated mice. *Behav Brain Res.* 2013;243:153-157.
70. **Nakao Y, Horiguchi M, Nakamura R, Sasaki-Hamada S, C, Taichi Funane, Ozawa R, et al.** LARETH-25 and b-CD improve central transitivity and central pharmacological effect of the GLP-2 peptide. *Int J Pharm.* 2016;515:37–45.
71. **Wismann P, Barkholt P, Secher T, Vrang N, Hansen HB, Jeppesen PB, et al.** The endogenous preproglucagon system is not essential for gut growth homeostasis in mice. *Molecular Metabolism.* 2017;6: 681-692.
72. **Rowland KJ, Brubaker LP.** The “cryptic” mechanism of action of glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 301(1):1–8.
73. **Angelone T, Filice E, Quintieri AM, Imbrogno S, Amodio N, Pasqua T, et al.** Receptor identification and physiological characterization of glucagon-like peptide-2 in the rat heart. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22(6):486-94.
74. **El-Jamal N, Erdual E, Neunlist M, Koriche D, Dubuquoy C, Maggiorotto F, et al.** Glucagon-like peptide-2: broad receptor expression, limited therapeutic effect on intestinal inflammation and novel role in liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;1;307(3):G274-85.

75. **Khan D, Vasu S, Moffett RC, Irwin N, Flatt PR.** Differential expression of glucagon-like peptide-2 (GLP-2) is involved in pancreatic islet cell adaptations to stress and beta-cell survival. *Peptides*. 2017;95:68–75.
76. **Baldassano S, Amato A, Cappello F, Rappa F, Mulè F.** Glucagon-like peptide-2 and mouse intestinal adaptation to a high-fat diet, *J. Endocrinol.* 2013;217:11–20.
77. **Rotondo A, Amato A, Baldassano S, Lentini L, Mulè F.** Gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-2 in mice fed a high-fat diet or fasted, *Peptides*. 2011;32(8):1587-92.
78. **Li F, Lu L, Peng Y, Zhang Y, Gao J, Zhou D, et al.** Increased GLP2R expression in gastric chief cells of patients with severe obesity regardless of diabetes status. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(8):1303-1305.
79. **DaCambra MP, Yusta B, Sumner-Smith M, Crivici A, Drucker DJ, Brubaker PL.** Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. *Biochemistry*. 2000;39:8888–8894.
80. **Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, Vyas TB, Rizkalla G, Wang H, et al.** Prototypic G protein–coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:1569–1573.
81. **Martin GR, Beck PL, Sigalet DL.** Gut hormones, and short bowel syndrome: the enigmatic role of glucagon-like peptide-2 in the regulation of intestinal adaptation. *World J Gastroenterol*. 2006;12(26):4117-4129.
82. **de Heuvel E, Wallace L, Sharkey KA, Sigalet DL.** Glucagon-like peptide 2 induces vasoactive intestinal polypeptide expression in enteric neurons via phosphatidylinositol 3-kinase- γ signaling. *Am J Physiol*. 2012;303(8):E994–1005.
83. **Yusta B, Boushey RP, Drucker DJ.** The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase–independent pathway. *J Biol Chem*. 2000;275:35345–35352.
84. **Yusta B, Estall J, Drucker DJ.** GLP-2 receptor activation engages Bad and glycogen synthase kinase 3 in a protein kinase A–dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2002;277:24896–24906.
85. **Burrin DG, Stoll B, Guan X, Cui L, Chang X, Hadsell D.** GLP-2 rapidly activates divergent intracellular signaling pathways involved in intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1):E281-91.
86. **Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D.** The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(4):231-43.
87. **Estall JL, Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ.** The Glucagon-like Peptide-2 Receptor C Terminus Modulates β -Arrestin-2 Association but Is Dispensable for

- Ligand-induced Desensitization, Endocytosis, and G-protein-dependent Effector Activation. *J Biol Chem.* 2005;280(23):22124-22134.
88. **Estall JL, Yusta B, Drucker DJ.** Lipid raft-dependent glucagon-like peptide-2 receptor trafficking occurs independently of agonist-induced desensitization. *Mol Biol Cell.* 2004;15(8):3673-3687.
 89. **Orskov C, Hartmann B, Poulsen SS, Thulesen J, Hare KJ, Holst JJ.** GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept.* 2005;124(1-3):105-12.
 90. **Dubé PE, Forse CL, Bahrami J, Brubaker PL.** The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology.* 2006;131(2):589–605.
 91. **Guan X, Karpen HE, Stephens J, Bukowski JT, Niu S, Zhang G.** GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology.* 2006;130(1):150-164.
 92. **Sigalet DL, Wallace LE, Holst JJ, Martin GR, Kaji T, Tanaka H, Sharkey KA.** Enteric neural pathways mediate the anti-inflammatory actions of glucagon-like peptide 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(1):G211-21.
 93. **Rowland KJ, Brubaker PL.** Life in the crypt: a role for glucagon-like peptide-2? *Mol Cell Endocrinol.* 2008;25:288(1-2):63-70.
 94. **Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC.** Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr.* 2011;141(5):769–776.
 95. **Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD.** Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963;11:330–334.
 96. **Pilz RB, Casteel DE.** Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res.* 2003;93:1034-1046.
 97. **Michaela Kuhn.** Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev.* 2016;96:751–804.
 98. **Madhusoodanan KS, Murad F.** NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells. *Neurochem Res.* 2007; 32:681-694.
 99. **Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, et al.** Proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA(2)-IIA expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation.* 2001;8:121.
 100. **Bellamy TC, Garthwaite J.** The receptor-like properties of nitric oxide-activated soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Mol Cell Biochem.* 2002;230:165-176.

101. **Schultz G, Böhme E, Munske K.** Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 1969;8:1323–1332.
102. **White AA, Aurbach GD.** Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1969;191:686–697.
103. **Hardman JG, Sutherland EW.** Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* 1969;244:6363–6370.
104. **Kimura H, Murad F.** Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem;* 1974;249:6910–6916.
105. **Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG.** Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem.* 1975;250:374–381.
106. **Mittal CK, Murad F.** Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1977;3:381–391.
107. **Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F.** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:3203–3207.
108. **Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G.** Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 1981;132:71–74.
109. **Kraehling JR, Sessa WC.** Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2017;120(7):1174–1182.
110. **Derbyshire ER, Marletta MA.** Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:533–59.
111. **Ding JD, Burette A, Weinberg RJ.** Expression of soluble guanylyl cyclase in rat cerebral cortex during postnatal development. *J Comp Neurol.* 2005;485(3):255–265.
112. **Russwurm M, Koesling D.** Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem.* 2002;230(1-2):159–164.
113. **Beuve A.** Thiol-Based Redox Modulation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Receptor. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26(3):137–149.
114. **Montfort WR, Wales JA, Weichsel A.** Structure and Activation of Soluble Guanylyl La activación de la GCsCyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26(3):107–121.
115. **Zhou Z, Sayed N, Pyriochou A, Roussos C, Fulton D, Beuve A, et al.** Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(10):1803–10.

116. **Mergia E, Russwurm M, Zoidl G, Koesling D.** Major occurrence of the new $\alpha 2\beta 1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal*. 2003;15(2):189-95.
117. **Zabel U, Häusler C, Weeger W, Schmidt H.** Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione S-transferase affinity tag. *J Biol Chem*. 1999;274:18149–18152.
118. **Haase N, Haase T, Kraehling JR, Behrends S.** Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive guanylyl cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol*. 2010; 1;80(11):1676-83.
119. **Haase N, Haase T, Seeanner M, Behrends S.** Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. *J Neurochem*. 2010;112:542–551.
120. **Cai C, Chen SY, Zheng Z, Omwancha J, Lin MF, Balk SP, et al.** Androgen regulation of soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ mediates prostate cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2007;26:1606–1615.
121. **Cai C, Hsieh CL, Gao S, et al.** Soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ and p53 cytoplasmic sequestration and down-regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2012;26(2):292–307.
122. **Bhansali M, Shemshedini L.** COP9 Subunits 4 and 5 Target Soluble Guanylyl Cyclase $\alpha 1$ and p53 in Prostate Cancer Cells. *Mol Endocrinol*. 2014;28:834–845.
123. **Pifarré P, Baltrons MA, Földi I, García A.** NO-sensitive guanylyl cyclase $\beta 1$ subunit is peripherally associated to chromosomes during mitosis. Novel role in chromatin condensation and cell cycle progression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(8-9):1719-30.
124. **Russwurm M, Wittau N, Koesling D.** Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha 2\beta 1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44647–44652
125. **Hochheiser J, Haase T, Busker M, Sömmer A, Kreienkamp HJ, Behrends S.** Heterodimerization with the $\beta 1$ subunit directs the $\alpha 2$ subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase to calcium-insensitive cell-cell contacts in HEK293 cells: Interaction with Lin7a. *Biochem Pharmacol*. 2016;122:23-32.
126. **Borel JP, Randoux A, Maquart FX, Le Peuch C, Valeyre J.** *Biochimie Dynamique*. 1ª edición, Maloine Paris: Décarie; 1987.
127. **Koolman J, Röhm KH.** *Bioquímica Texto y Atlas*. 3ª edición, Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.
128. **Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM.** Presence and biological actions of insulin in the brain. Pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:161.

129. **Margolis RU, Altszuler N.** Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature*. 1967;215(5108):1375–6.
130. **Maolood N, Meister B.** Protein components of the blood–brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema–nucleus tractus solitarius región. *J Chem Neuroanat*. 2009;37:182–195.
131. **Schechter R, Whitmire J, Holtzclaw L, George M, Harlow R, Devaskar SU.** Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. *Brain Res*. 1992;582(1):27–37.
132. **Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR.** Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res*. 2012;2012:384017.
133. **Banks WA, Kastin AJ.** Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides*. 1998;19(5):883–9.
134. **Devaskar SU, Holekamp N, Karycki L, Devaskar UP.** Ontogenesis of the insulin receptor in the rabbit brain. *Horm Res*. 1986;24(4):319–27.
135. **Duffy KR, Pardridge WM.** Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res*. 1987;420(1):32–8.
136. **Eckert GP, KIRS-ch C, Leutz S, Wood WG, Muller WE.** Cholesterol modulates amyloid beta-peptide's membrane interactions. *Pharmacopsychiatry*. 2003;36(2):S136–4310.
137. **Clarke DW, Mudd L, Boyd FT Jr, Fields M, Raizada MK.** Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *J Neurochem*. 1986;47(3):831–6.
138. **Dorn A, Rinne A, Bernstein HG, Hahn HJ, Ziegler M.** Insulin and C-peptide in human brain neurons (Insulin/C-peptide/ brain peptides/ immunchemistry/ radioimmunoassay). *J Hirnforsch*. 1983;24(5):495–9.
139. **Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar PA, Giddings SJ.** Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept*. 1993;48(1-2):55-63.
140. **Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS.** Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8445-54.
141. **Frolich L, Blum-Degen D, Berstein HG, Engelsberg S, Humrich J, Laufer S, et al.** Brain insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 1988;105(4-5):423-38.
142. **Erol A.** An Integrated and Unifying Hypothesis for the Metabolic Basis of Sporadic Alzheimer's Diseases. *J Alzheimers Dis*. 2008;13(3):241-53.
143. **Bernard C.** Leçons de physiologie expérimentale appliquées à la médecine. J. B. Baillière et fils. 1855.

144. **Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA, Macleod, et al.** The effect produced on diabetes by extracts of pancreas. *Trans Assoc Am Phys.* 1922;37:337-347.
145. **Banting FG, Best CH.** The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med.* 1922;7:251-266.
146. **Havrankova J, D Schmechel D, Roth J, Brownstein M.** Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(11):5737-41.
147. **Kullmann S, Heni M, Hallschmid M, Fritsche A, Preissl H, Häring HU.** Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. *Physiol Rev.* 2016; 96: 1169-1209.
148. **Akintola AA, van Heemst D.** Insulin, aging, and the brain: mechanisms and implications. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:13.
149. **Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al.** Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 2000;289:2122-2125.
150. **Mc Allister E, Pacheco-Lopez G, Woods SC, Langhans W.** Inconsistencies in the hypophagic action of intracerebroventricular insulin in mice. *Physiol Behav.* 2015;151:623-628.
151. **Woods SC, Langhans W.** Inconsistencies in the assessment of food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303:E1408-E1418.
152. **Nagaraja TN, Patel P, Gorski M, Gorevic PD, Patlak CS, Fenstermacher JD.** In normal rat, intraventricularly administered insulin-like growth factor-1 is rapidly cleared from CSF with limited distribution into brain. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2005;2:5.
153. **Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L.** Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci.* 2002;5:566-572.
154. **Könner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X et al.** Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* 2007;5:438-449.
155. **Ramón y Cajal S.** Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados. Tomo I: Imprenta y Librería de Nicolás Moya. 1899.
156. **Navarrete M, Araque A.** The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking. *Front Neuroanat.* 2014;19:8:33
157. **Ramón y Cajal S.** Algunas conjeturas sobre el mecanismo anatómico de la ideación, asociación y atención. *Rev. Med. Cirug.* 1895;36:3–14.
158. **Ramón y Cajal S.** Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol.* 1913;XI:225–315.

159. **Wilhelm F, Hirrlinger J.** Multifunctional Roles of NAD⁺ and NADH in Astrocytes. *Neurochem Res.* 2012;37(11):2317-25.
160. **Eto K, Kim SK, Takeda I, Nabekura J.** The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies. *Neurosci Res.* 2018;126:3-8.
161. **Vasile F, Dossi E, Rouach N.** Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 2017;222:2017–2029.
162. **Marina N, Turovsky E, Christie IN, Hosford PS, Hadjihambi A, Korsak A, et al.** Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte. *Glia.* 2018;66:1185–1199.
163. **Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A.** Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. *PLoS One.* 2013;8(3):e60282.
164. **Quincozes-Santos A, Bobermin LD, de Assis AM, Gonçalves CA, Souza DO.** Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1863(1):1-14.
165. **Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ.** Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011;14:724–738
166. **Magistretti PJ, Allaman I.** A celular perspective on brain metabolism and functional imaging. *Neuron.* 2015;86(4):883-901.
167. **Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, et al.** Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;107(2):255-64.
168. **Allaman I, Magistretti PJ.** in *Fundamental Neuroscience* (eds Squire LR. Et al.) 261–284 (Academic Press, San Diego), 2013
169. **Magistretti PJ, Allaman I.** Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nature reviews.* 2018;19:235-249.
170. **García-Nogales P, Almeida A, Bolaños JP.** Peroxynitrite Protects Neurons against Nitric Oxide-mediated Apoptosis, A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J Biol Chem.* 2003;278(2):864-74.
171. **Yusta B, Somwar R, Wang F, Munroe D, Grinstein S, Klip A, et al.** Identification of glucagon-like peptide-2 (GLP-2)-activated signaling pathways in baby hamster kidney fibroblasts expressing the rat GLP-2 receptor. *J Biol Chem.* 1999;274:30459–30467.
172. **Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, et al.** Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res.* 2000;90:13–18.
173. **Velázquez E, Ruiz-Albusac JM, Blázquez E.** Glucagon-like peptide-2 stimulates the proliferation of cultured rat astrocytes. *Eur J Biochem.* 2003;270:3001–3009.

174. **Velázquez E, Blázquez E, Ruiz-Albusac JM.** Synergistic effect of glucagon-like peptide 2 (GLP-2) and of key growth factors on the proliferation of cultured rat astrocytes. Evidence for reciprocal upregulation of the mRNAs for GLP-2 and IGF-I receptors. *Mol Neurobiol.* 2009;40:183-193.
175. **Velázquez E, Santos A, Montes A, Blázquez E, Ruiz-Albusac JM.** 25-Hydroxycholesterol has a dual effect on the proliferation of cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology.* 2006;51:229–237.
176. **Velázquez E, Blázquez E, Ruiz-Albusac JM.** Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) Modulates the cGMP Signalling Pathway by Regulating the Expression of the Soluble Guanylyl Cyclase Receptor Subunits in Cultured Rat Astrocytes *Mol Neurobiol.* 2012;46:242–250.
177. **Ruiz-Albusac JM, Velázquez E, Iglesias J, Jiménez E, Blázquez E.** Insulin promotes the hydrolisis os a glycosil phosphatidylinositol in cultured rat astroglial cells. *J Neurochem.* 2007;68:10-19.
178. **Barna BP, Estes ML, Jacobs BS, Huddon S, Ransohoff RM.** Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. *J Neuroimmunol.* 1990;30(2-3):239-43.
179. **Choi I, Kim J, Jeong HK, Kim B, Jou I, Park SM, et al.** PINK1 Deficiency Attenuates Astrocyte Proliferation Through Mitochondrial Dysfunction, Reduced AKT and Increased p38 MAPK Activation, and Downregulation of EGFR. *GLIA.* 2013;61:800–812.
180. **Kelleher JA, Chan PH, Chan TY, Gregory GA.** Modification of hypoxia-induced injury in cultured rat astrocytes by high levels of glucose. *Stroke.* 1993;24:855-63.
181. **Feng Y, Demehri FR, Xiao W, Tsai YH, Jones JC, Brindley CD, et al.** Interdependency of EGF and GLP-2 Signaling in Attenuating Mucosal Atrophy in a Mouse Model of Parenteral Nutrition. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;3:447–468.
182. **Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G, et al.** High Glucose Promotes Pancreatic Cancer Cell Proliferation via the Induction of EGF Expression and Transactivation of EGFR. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27074.
183. **Takahashi S, Izawa Y, Suzuki N.** Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments *ASN Neuro.* 2012;4(2):e00078.
184. **Petersen YM, Burrin DG, Sangild PT.** GLP-2 has differential effects on small intestine growth and function in fetal and neonatal pigs. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2001;281:R1986–R1993.
185. **Lovshin J, Yusta B, Iliopoulos I, Migirdicyan A, Dabbleh I, Brubaker PL, et al.** Ontogeny of the Glucagon-Like Peptide-2 Receptor Axis in the Developing Rat Intestine. *Endocrinology.* 2000;141: 4194–4201.
186. **Petersen YM, Hartmann B, Holst JJ, Le Huerou-Luron I, Bjørnvad CR, Sangild PT.** Introduction of Enteral Food Increases Plasma GLP-2 and Decreases GLP-2 Receptor mRNA Abundance during Pig Development. *J Nutr.* 2003;133:1781–1786.
187. **Fukunaga T, Sasaki M , Araki Y, Okamoto T, Yasuoka T, Tsujikawa T, et al.** Effects of the Soluble Fibre Pectin on Intestinal Cell Proliferation, Fecal Short Chain Fatty Acid Production and Microbial Population. *Digestion.* 2003;67:42–4.

188. **Wu J, Qi KK, Xu ZW.** Porcine glucagon-like peptide-2 microspheres ameliorate inflammation in lipopolysaccharide-challenged weaning piglets. *J. Anim. Sci.* 2016;94:5286–5294.
189. **Qi KK, Wu J, Deng B, Li YM, Xu ZW.** PEGylated porcine glucagon-like peptide-2 improved the intestinal digestive function and prevented inflammation of weaning piglets challenged with LPS. *Animal.* 2015;9(9):1481-9.
190. **Nikiforou M, Vlassaks E, Strackx E, W Kramer B, Vles JS, Gavilanes AW.** Preconditioning by oxygen-glucose deprivation preserves cell proliferation and reduces cytotoxicity in primary astrocyte. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(1):61-7.
191. **Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L.** Acute Intracarotid Glucose Injection Towards the Brain Induces Specific c-fos Activation in Hypothalamic Nuclei: Involvement of Astrocytes in Cerebral Glucose-Sensing in Rats. *J NEUROENDOCRINOL.* 2004;16:464–471.
192. **Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide AM, Krebs N, et al.** Insulin Promotes Glycogen Storage and Cell Proliferation in Primary Human Astrocytes. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e21594.
193. **Beauquis J, Homo-Delarche F, Giroix MH, Ehses J, Coulaud J, Roig P, et al.** Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats. *Exp Neurol.* 2010;222(1):125-134.
194. **Lechuga-Sancho AM, Arroba AI, Frago LM, García-Cáceres C, de Célis AD, Argente J, et al.** Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology.* 2006;147(11):5314-24.
195. **Bramanti V, Grasso S, Tibullo D, Giallongo C, Raciti G, Viola M, et al.** Modulation of extracellular signal-related kinase, cyclin D1, glial fibrillary acidic protein, and vimentin expression in estradiol-pretreated astrocyte cultures treated with competence and progression growth factors. *J Neurosci Res.* 2015;93(9):1378-87.
196. **Han J, Zhang L, Guo H, Wysham QZ, Roque DR, Willson AK, et al.** Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecologic Oncology.* 2015;138:668–675.
197. **Tabernero A, Medina JM, Giaume C.** Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *Journal of Neurochemistry,* 2006;99: 1049–106.
198. **Muhic M, Vardjan N, Chowdhury NH, Zorec R, Kreft M.** Insulin and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Modulate Cytoplasmic Glucose and Glycogen Levels but Not Glucose Transport across the Membrane in Astrocytes. *J Bio Chem.* 2015;290(17):11167–11176.
199. **Takahashi S, Izawa Y, Norihiro S.** Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments. *ASN Neuro.* 2012;4(2):e00078.
200. **Abe T, Takahashi S, Suzuki N.** Oxidative metabolism in cultured rat astroglia: effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:153–160.

201. **van Deijk ALF, Camargo N, Timmerman T, Heistek T, Brouwers JF, Mogavero F, et al.** Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia*. 2017;65:670–682.
202. **Camargo VN, Smit AB, Verheijen MHG.** SREBPs: SREBP function in glia–neuron interactions. *FEBS Journal*. 2009;276:628–636.
203. **Li Y, Xu S, Mihaylova M, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al.** AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. *Cell Metab*. 2011;13(4):376–388.
204. **Dong Q, Giorgianni F, Beranova-Giorgianni S, Deng X, O’Meally RN, Bridges D, et al.** Glycogen synthase kinase-3-mediated phosphorylation of serine 73 targets sterol response element binding protein-1c (SREBP-1c) for proteasomal degradation. *Bioscience Reports*. 2016;36:e00284.
205. **Knebel B, Lehr S, Hartwig S, Haas J, Kaber G, Dicken HD, et al.** Phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by p38 kinases, ERK and JNK influences lipid metabolism and the secretome of human liver cell line HepG2. *Arch Physiol Biochem*. 2014;120(5):216–27.
206. **Liu C, Lin JD.** PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011;43:248–257.
207. **Thirupathi A, de Souza CT.** Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. *J Physiol Biochem*. 2017;73:487–494.
208. **Guo X, Jiang Q, Tuccitto A, Chan D, Alqawlaq S, Won GJ, Sivak JM.** The AMPK-PGC-1 α signaling axis regulates the astrocyte glutathione system to protect against oxidative and metabolic injury. *Neurobiol Dis*. 2018;113:59–69.
209. **Rutter GA, Da Silva XG, Leclerc I.** Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem*. 2003;375(1):1–16.
210. **Hardie DG, Ross FA, Hawley SA.** AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):251–262.
211. **Hardie DG, Hawley SA, Scott JW.** AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept. *J Physiol* 2006;574(1):7–15
212. **Hardie DG, Sakamoto K.** AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology*. 2006;21:48–60.
213. **Ríos M, Foretz M, Viollet B, Prieto A, Fraga M, Jose A. Costoya JA, et al.** AMPK Activation by Oncogenesis Is Required to Maintain Cancer Cell Proliferation in Astrocytic Tumors. *Cancer Res*; 2013;73(8) :2628–38.
214. **Zhang DD, Zhang JG, Wang YZ, Liu Y, Liu GL, Li XY.** Per-Arnt-Sim Kinase (PASK): An Emerging Regulator of Mammalian Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients*. 2015;7:7437–7450.
215. **Hurtado-Carneiro V, Roncero I, Egger SS, Wenger RH, Blazquez E, Sanz C, et al.** PAS Kinase Is a Nutrient and Energy Sensor in Hypothalamic Areas Required for the Normal Function of AMPK and mTOR/S6K1. *Mol Neurobiol*. 2014;50:314–326.
216. **Kola K.** Role of AMP-Activated Protein Kinase in the Control of Appetite. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:942–951.
217. **Taïb B, Bouyakdan K, Hryhorczuk C, Rodaros D, Fulton S, Alquier T.** Glucose Regulates Hypothalamic Long-chain Fatty Acid Metabolism via AMP-

- activated Kinase (AMPK) in Neurons and Astrocytes. *J Bio Chem.* 2013;288(52):37216–37229.
218. **Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, et al.** Bloodbrain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem.* 1999;72: 238–247.
219. **Cidad P, Garcia-Nogales P, Almeida A, Bolanos JP.** Expression of glucose transporter GLUT3 by endotoxin in cultured rat astrocytes: the role of nitric oxide. *J Neurochem.* 2001;79:17–24.
220. **Lizárraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Miguel Santos L, Martínez-Hondurilla CJ, Alvarez C, Escrivá F.** Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, P38 MAPK, an JNK in the cerebral cortex of suckling rats. *J. Neurochem.* 2010;112: 123-133.
221. **Thorens B.** GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia.* 2015;58:221–232.
222. **Roncero I, Alvarez E, Chowen JA, Sanz C, Rábano A, Vázquez P, et al.** Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *Journal of Neurochemistry,* 2004, 88, 1203–1210.
223. **Yoo BK, Choi JW, Han BH, Kim WK, Kim HC, Ko KH.** Role of MAPK/ERK1/2 in the glucose deprivation-induced death in immunostimulated astroglia. *Neurosci Lett.* 2005;376:171–176.
224. **Li N, Liu BW, Ren WZ, Liu JX, Li SN, Fu SP, et al.** GLP-2 Attenuates LPS-Induced Inflammation in BV-2 Cells by Inhibiting ERK1/2, JNK1/2 and NF- κ B Signaling Pathways. *Int J Mol Sci.* 2016, 17(2):190.
225. **Kannen V, Britto Garcia S, Stopper H, Waaga-Gasser AM.** Glucagon-like peptide 2 in colon carcinogenesis: Possible target for anti-cancer therapy? *Pharmacol Ther.* 2013;139:87-94.
226. **Copps KD, White MF.** Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS-1 and IRS-2. *Diabetologia* 2012; 55:2565–2582.
227. **Garwood CJ, Ratcliffe LE, Morgan SV, Simpson JE, Owens H, Vazquez-Villaseñor I, et al.** Wharton. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol Brain.* 2015;8:51-67.
228. **Shi Y, Wang J, Chandarlapaty S, Cross J, Thompson C, Rosen N, Jiang X.** PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS-1. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(6):522-527.
229. **Kimber WA, Deak M, Prescott AR, Alessi DR.** Interaction of the protein tyrosine phosphatase PTPL1 with the PtdIns(3,4) P₂-binding adaptor protein TAPP1. *Biochem. J.* 2003;376:525–535.
230. **Kuhné MR, Zhao Z, Rowles J, Lavan BE, Shen SH, Fischer EH, et al.** Dephosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the tyrosine phosphatase PTP2C. *J Biol Chem.* 1994;269(22):15833-15837.
231. **Glynn EL, Lujan HL, Kramer VJ, Drummond MJ, DiCarlo SE, Rasmussen BB.** A chronic increase in physical activity inhibits fed-state mTOR/S6K1 signaling and reduces IRS-1 serine phosphorylation in rat skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008;33(1):93-101.

232. **Castermans D, Somers I, Kriel J, Louwet W, Wera S, Versele M, et al.** Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Res.* 2012;22:1058-1077.
233. **Law NC, White MF, Hunzicker-Dunn ME.** G protein-coupled receptors (GPCRs) That Signal via Protein Kinase A (PKA) Cross-talk at Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) to Activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT Pathway. *J Biol Chem.* 2016;291(53):27160-27169.
234. **Qi KK, Sun YQ, Wan J, Deng B, Men XM, Wu J et al. W.** Effect of porcine glucagon-like peptides-2 on tight junction in GLP-2R + IPEC-J2 cell through the PI3k/Akt/mTOR/p70S6K signalling pathway. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2017;101:1242–1248.
235. **Beurel E, Grieco SF, Joep RS.** Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015;0:114–131.
236. **Russo CD, Lisi L, Feinstein DL, Navarra P.** mTOR Kinase, a Key Player in the Regulation of Glial Functions: Relevance for the Therapy of Multiple Sclerosis. *Glia.* 2012;61:301–311.
237. **Lloyd BA, Hake HS, Ishiwata T, Farmer CE, Loetz EC, Fleshner M, et al.** Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. *Behav Brain Res.* 2017; 323: 56–67.
238. **Jewell JL, Guan KL.** Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends in Biochemical Sciences.* 2013;38(5):233-242.
239. **Foster KG, Fingar DC.** Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem.* 2010;285(19):14071–14077.
240. **Maiese K, Chong ZZ, ShangYC, Wang S.** mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends in Molecular Medicine* January 2013;19(1):51-60.
241. **Magnuson B, Ekim B, Fingar DC.** Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012;441:1-21.
242. **Cheng P, Alberts I, Li X.** The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(8):783-789.
243. **Zhao Y, Wang FJ, Wang P, Qi HB, Wang SL.** Transfection and identification of the cloned strain that stably expressing glucagon like peptide-2 receptor in CaCO2 cell lines. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2006;22(4):258-61.
244. **Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ.** The HeLa Cell Glucagon-Like Peptide-2 Receptor Is Coupled to Regulation of Apoptosis and ERK1/2 Activation through Divergent Signaling Pathways. *Molecular Endocrinology* 2005;19(2):459–473.
245. **Krumenacker JS, Kots A, Murad F.** Effects of the JNK inhibitor anthra[1,9-*cd*]pyrazol-6(2*H*)-one (SP-600125) on soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ gene regulation and cGMP synthesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C778–C784.

246. **Krumenacker JS, Hyder SM, and Murad F.** Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98: 717–722.
247. **Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E.** Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic b-cells. *J Pineal Res*. 2009; 46:140–147.
248. **Baltrons MA, Borán MS, Pifarré P, García A.** Regulation and Function of Cyclic GMP-Mediated Pathways in Glial Cells. *Neurochem Res*. 2008;33:2427–2435.
249. **Gibb BJ, Garthwaite J.** Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci*. 2001;13(3):539–44.
250. **Jurado S, Sánchez-Prieto J, Torres M.** Differential expression of NO-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors. *J Cell Sci*. 2003;116, 3165–3175.
251. **Klöss S, Rodenbach D, Bordel R, Mülsch A.** Human-Antigen R (HuR) Expression in Hypertension Downregulation of the mRNA Stabilizing Protein HuR in Genetic Hypertension. *Hypertension*. 2005;45:1200–1206.
252. **Martín-Garrido A, González-Ramos M, Grier M, Guijarro B, Cannata-Andia J, Rodríguez-Puyol D, et al.** H₂O₂ Regulation of Vascular Function Through sGC mRNA Stabilization by HuR. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:567–573.
253. **Cabilla JP, Nudler SL, Ronchetti SA, Quinteros FA, Lasaga M., Duvilanski BH.** Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Differentially Regulated by Nuclear and Non-Nuclear Estrogen Pathways in Anterior Pituitary Gland. *PLoS ONE*. 2011;6(12): e29402.
254. **Bähre H, Danker KY, Stasch JP, Kaever V, Seifert R.** Nucleotidyl cyclase activity of soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443 (2014) 1195–1199.
255. **Garella R, Idrizaj E, Traini C, Squecco R, Vannucchi MG, et al Baccari.** Glucagon-like peptide-2 modulates the nitrergic neurotransmission in strips from the mouse gastric fundus. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(40): 7211–7220.
256. **Shimouchi A, Janssens SP, Bloch DB, Zapol WM, and Bloch KD.** cAMP regulates soluble guanylate cyclase β 1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1993;265: L456–L461.
257. **Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milici A, Murad F, Catravas JD.** Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension*. 1995;26: 696–704.

ANEXO

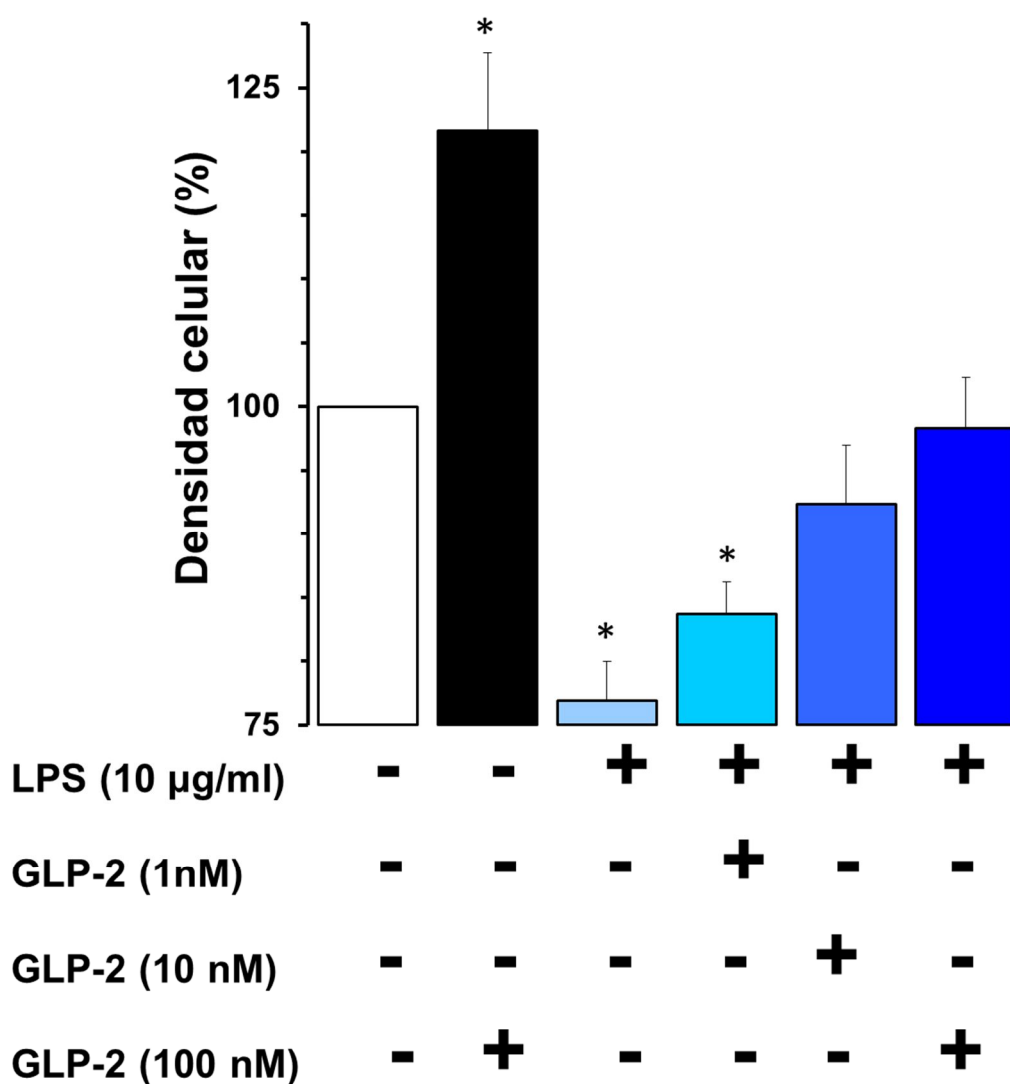


Figura A1. Efecto del LPS en ausencia y presencia de diversas dosis GLP-2 sobre la supervivencia de astrocitos de rata en cultivo Los astrocitos fueron incubados en DMEM-F12 libre de SBF en ausencia y presencia de los tratamientos indicados durante 24 horas. La densidad celular se midió por tinción de los núcleos con cristal violeta como se indica en “Material y Métodos”. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado, medida como la absorbancia a 560 nm en cada pocillo. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (Test t de Student para datos independientes).